

Aus dem Zentrum für Augenheilkunde der Universität zu Köln  
Klinik und Poliklinik für Allgemeine Augenheilkunde  
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. C. Cursiefen

# **Muster des retinalen Ganglienzellverlustes im experimentellen Glaukommodell**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der zahnärztlichen Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität zu Köln

vorgelegt von  
Jennifer Kern  
aus Leverkusen

promoviert am  
19. Dezember 2023



Dekan:           Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink

1. Gutachterin: Universitätsprofessorin Dr. med. V. Prokosch
2. Gutachter:   Privatdozent Dr. med. R. Hörster

## Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

Frau Universitätsprofessorin Dr. med. Verena Prokosch

Frau Dr. med. Hanhan Liu

Weitere Personen waren an der Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die in dieser Arbeit angegebenen Experimente sind nach entsprechender Anleitung durch Frau Dr. med. Hanhan Liu von mir selbst ausgeführt worden.

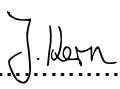
Die zervikale Dislokation der Mäuse, die Herstellung der Blockierungslösung sowie die Herstellung der Querschnitte im Kryostat wurde/n mit Unterstützung der medizinisch-technischen Assistentin Frau Rodica Maniu durchgeführt.

Anweisungen bezüglich der Einstellung und des Umgangs mit den Laborgeräten/ -utensilien und der Mikroskopeinstellung wurden mir durch Mitarbeiter der AG Langmann gegeben.

## Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 31.08.2023

Unterschrift: .....  .....

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen besonderen Dank nachstehenden Personen entgegen bringen, ohne deren Mithilfe die Anfertigung dieser Dissertation niemals zustande gekommen wäre:

Bedanken möchte ich mich an erster Stelle bei Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Gereon R. Fink, Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Claus Cursiefen sowie Frau Univ.-Prof. Dr. med. Verena Prokosch für die Ermöglichung der Promotion.

Ein besonderer Dank geht an Frau Univ.-Prof. Dr. med. Verena Prokosch für die Überlassung des Themas, die Betreuung meiner Arbeit und für die Übernahme des Erstgutachtens.

Auch bedanke ich mich bei meiner Ansprechpartnerin Frau Dr. med. Hanhan Liu für ihr stetiges Engagement, ihre fachliche Unterstützung und ihr freundschaftliches Verhältnis.

Mein Dank gilt ebenso der AG Langmann, mit deren Mitarbeiter ich in stetigem Kontakt während der experimentellen Untersuchungen im Anatomischen Institut der UK Köln stand.

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Robert Hörster danke ich herzlich für die Bereitschaft zur Übernahme des Zweitgutachtens.

Von ganzem Herzen danke ich meiner Familie, die stets an mich geglaubt und mich über die gesamte Zeit unterstützt hat.

Ein besonderer Dank geht an Opa Heribert, der mir bei meiner Arbeit vom Himmel aus zugesehen hat und stets an meiner Seite stand.

Opa Heribert

# Inhaltsverzeichnis

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>8</b>
<b>1. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>9</b>
<b>2. EINLEITUNG</b>	<b>11</b>
2.1. Einführung in die Thematik	11
2.2. Die vom Glaukom betroffenen Anteile des Augapfels	12
2.2.1. Äußere Auge	12
2.2.1.1. Lederhaut	12
2.2.2. Innere Auge	12
2.2.2.1. Vorderkammer	12
2.2.2.2. Hinterkammer	13
2.2.2.3. Ziliarkörper	13
2.2.2.4. Netzhaut	13
2.3. Das Glaukom	16
2.3.1. Definition	16
2.3.2. Epidemiologie	16
2.3.3. Symptome	16
2.3.4. Risikofaktoren	17
2.3.5. Pathophysiologie	18
2.3.6. Einteilung	19
2.3.7. Diagnostik	20
2.3.8. Therapie	21
2.3.9. RGC-Subpopulationen: Morphologie, Differenzierung und Identifizierung	23
2.3.9.1. RGC-Morphologie und Strukturähnlichkeiten zu anderen Zellen	23
2.3.9.2. RGC-Subpopulationen bei Menschen und Nagetieren	24
2.3.9.3. Immunhistochemische Färbung	24
2.3.9.3.1. Technik	24
2.3.9.3.2. IHC-RGC-Marker	25
2.4. Fragestellungen und Ziel der Arbeit	27
<b>3. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>29</b>
3.1. Material	29

<b>3.2.</b>	<b>Methoden</b>	<b>29</b>
3.2.1.	Vorbereitungen experimentelles Glaukommodell	29
3.2.2.	Durchführung experimentelles Glaukommodell	31
3.2.3.	Färbung Retinaganzpräparate	33
3.2.4.	Herstellung und Färbung Querschnitte	34
3.2.5.	Mikroskopie	35
3.2.6.	Zellauszählung und Messung Fluoreszenzintensität	36
3.2.7.	Statistik	37
<b>4.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>39</b>
4.1.	Flatmounts	39
4.1.1.	Kontroll-Präparate	39
4.1.2.	Ergebnisse der 60mmHg-Präparate temporal, superior, nasal und inferior	39
4.1.3.	Ergebnisse der H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Präparate temporal, superior, nasal und inferior	40
4.1.4.	Ergebnisse der 60mmHg-Präparate zentral, mittig und peripher	49
4.1.5.	Ergebnisse der H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Präparate zentral, mittig und peripher	49
4.1.6.	Ergebnisse der 60mmHg- und H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Präparate in der Brn3a-, RBPMS- und Neurofilament-H-Färbung in den Querschnitten	58
4.1.7.	Ergebnisse der 60mmHg- und H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Präparate in der Brn3a-, RBPMS- und Neurofilament-H-Färbung abhängig vom Alter	59
<b>5.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>64</b>
<b>6.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>77</b>
<b>7.</b>	<b>ANHANG</b>	<b>83</b>
7.1.	Abbildungsverzeichnis	83
7.2.	Tabellenverzeichnis	84



## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AG	Arbeitsgemeinschaft
BSA	bovine serum albumin
DMEM/F12	Dulbecco's modified eagle medium/Nährstoffmischung F-12
FCS	fetales Kälberserum
FG	Fluorogold
GCL	Ganglienzellschicht
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
IHC	immunhistochemisch
IntDen	integrated density
IOD	intraokulärer Druck
ip	intrinsisch photosensitiv
mGCL	makuläre Ganglienzellschicht
mRNFL	makuläre retinale Nervenfaserschicht
ns	nicht signifikant
N.	Nervus
OCT	optische Kohärenztomographie
ONC	optic nerve crush
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PBS-T	phosphatgepufferte Salzlösung mit Triton
PFA	Paraformaldehyd
POWG	primäres Offenwinkelglaukom
P/S	Penicillin/Streptomycin
RGC	retinale Ganglienzelle
RNFL	retinale Nervenfaserschicht
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SD	Standardabweichung

# 1. Zusammenfassung

Hintergrund: Das Glaukom umfasst eine Gruppe von Augenerkrankungen, die mit einer irreversiblen Erblindung einhergehen.<sup>1</sup> Dabei ist der erhöhte Augeninnendruck beim Hochdruckglaukom der bekannteste Risikofaktor.<sup>2</sup> Jedoch ist dieser nicht am Normaldruckglaukom beteiligt.<sup>1</sup> Hierbei muss es einen anderen ursächlichen Faktor geben. Der oxidative Stress gehört ebenfalls zu den Faktoren, die an der Pathogenese des Glaukoms beteiligt sind.<sup>3</sup> Jedoch ist nicht klar, ob der durch den erhöhten Augeninnendruck verursachte oxidative Stress der ursächliche Faktor bei der Pathogenese des Glaukoms ist. Dies könnte Aufschluss über die Pathogenese des Normaldruckglaukoms geben.

Fragestellung/Zielsetzung: Es gibt Studien, die zeigen, dass Endothelzellen durch oxidativen Stress aber nicht durch einen erhöhten Augeninnendruck untergehen.<sup>4</sup> Interessanterweise gibt es bezogen auf die neuronale Ebene keine eindeutigen Ergebnisse. Wir möchten daher herausfinden, wodurch die Somata der retinalen Ganglienzellen sowie deren Axone geschädigt werden und untergehen. Zudem ist fraglich, ob der Untergang der retinalen Ganglienzellen und deren Axone in unterschiedlichen Bereichen der Retina besonders ausgeprägt ist und dies Rückschlüsse auf RGC-Subpopulationen gibt.

Material und Methoden: In dieser Arbeit wurde ein experimentelles Glaukommodell durchgeführt. Hierzu wurden Retinae (n=19) flach präpariert und inkubiert. Die Präparate wurden 60mmHg (n=6) oder H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (n=6) ausgesetzt und mit der Kontrollgruppe (n=6) verglichen. Ein Präparat wurde zur Anfertigung von Querschnitten für die jeweilige Gruppe präpariert. Zum Vergleich wurden die Retinae mit den Antikörpern Brn3a, RBPMS und Neurofilament-H sichtbar gemacht und fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

Ergebnisse: Gezeigt werden konnte, dass es mit > 60% einen starken generalisierten Verlust in den Brn3a markierten 60mmHg-Präparaten gab. Der nasale Quadrant sowie die zentral und mittig gelegenen Bereiche wiesen unter H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bedingungen den höchsten Verlust auf.

In der RBPMS-Färbung waren die inferioren und temporalen Quadranten stärker von einem Rückgang gegenüber 60mmHg betroffen. Ebenso war der Verlust in den peripheren Bereichen etwas höher. Unter H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bedingungen waren in der RBPMS-Färbung die zentral und mittig gelegenen Bereiche sowie der nasale Quadrant von einem stärkeren Verlust gekennzeichnet.

In den Neurofilament-H markierten Präparaten waren inferior, temporal und peripher stärker gegenüber 60mmHg betroffen. Der nasale und temporale Quadrant sowie die zentralen Bereiche wiesen unter H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bedingungen einen höheren Verlust auf.

Schlussfolgerung: Der oxidative Stress scheint unabhängig von einem erhöhten Druck einen Einfluss auf den Untergang der Ganglienzellsomata und deren Axone beim Glaukom zu haben. Zudem scheinen unterschiedliche Anfälligkeiten zwischen Nucleus und Zytoplasma vorhanden zu sein. Die Muster unterscheiden sich dabei jeweils zwischen 60mmHg- und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bedingungen. Die Nuclei waren in der gesamten Retina anfällig gegenüber erhöhtem Druck, während der Rückgang des Zytoplasmas im infero-temporal und eher peripher gelegenen Bereich sichtbar war. Interessanterweise waren die Nuclei und das Zytoplasma nasal sowie zentral und mittig anfälliger gegenüber oxidativem Stress. Dass die zentralen und nasalen Bereiche der Retina gegenüber oxidativem Stress anfälliger zu sein scheinen, zeigen auch die Ergebnisse des Axonrückganges. Neben dem nasalen Quadranten war aber auch der temporale Bereich der Axone vermehrt anfällig gegenüber oxidativem Stress, während dies gegenüber erhöhtem Druck die infero-temporal gelegenen, eher peripheren Bereiche waren. Zusammenfassend scheinen die Nuclei in der gesamten Retina unter erhöhtem Druck unterzugehen, während das Zytoplasma und die Axone eher im infero-temporalen Bereich sowie peripher sensibel zu sein scheinen. Gegenüber oxidativem Stress scheinen die zentral und nasal gelegenen Axone, Nuclei und das Zytoplasma anfällig zu sein.

## 2. Einleitung

### 2.1. Einführung in die Thematik

Das Glaukom umfasst eine Gruppe von Augenerkrankungen, die mit einer irreversiblen progredienten Degeneration der neuronalen Fasern des Nervus opticus (N. opticus), einem Zelltod der retinalen Ganglien und der Exkavation des Sehnervenkopfes einhergehen.<sup>1 5</sup> Es ist eine der häufigsten Ursachen für Erblindung.<sup>1</sup>

Das Risiko am Glaukom zu erkranken steigt mit zunehmendem Alter an: 2,93% aller Menschen in Europa erkranken ab dem 40. Lebensjahr an einem Glaukom, während bereits 10% über das 90. Lebensjahr betroffen sind.<sup>1 6</sup>

Es wird zwischen einem Normaldruckglaukom und einem Hochdruckglaukom unterschieden. Während beim Hochdruckglaukom der erhöhte intraokuläre Druck (IOD) die wichtigste klinische Manifestation darstellt, besteht beim Normaldruckglaukom ein IOD im Normbereich.<sup>1 2</sup> Somit kann man mit einer Druckmessung des IOD's ein Glaukom nicht ausschließen.<sup>1</sup> Die Behandlung des Hochdruckglaukoms besteht primär in der Senkung des IOD's durch Augentropfen.<sup>1</sup> Die Behandlung des Normaldruckglaukoms besteht ebenfalls in der Senkung des IOD's, aber gleichermaßen in der internistischen Betreuung.<sup>7</sup> Operative Verfahren können ebenso in Betracht gezogen werden.<sup>1</sup> Um präventiv gegen diese Erkrankung vorzugehen und die Behandlungsmethoden zu optimieren, ist die Ätiologie dieser Erkrankung noch nicht genug erforscht. Es wurde bereits herausgefunden, dass ein erhöhter IOD eine endotheliale Dysfunktion der retinalen Arteriolen auslöst. Durch diese vaskuläre Dysfunktion kommt es zu einer verstärkten Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Somit scheint oxidativer Stress an der Pathogenese des Glaukoms beteiligt zu sein.<sup>3</sup> Bedeutend ist, dass die immunhistochemischen (IHC) Antikörper Neurofilament-H (Anti- Neurofilament H Non-Phosphorylated) axonale Fasern markieren.<sup>8</sup> Die IHC-Antikörper Brn3a (POU domain protein 3A) färben den Nucleus der retinalen Ganglienzellen (RGCs), die Färbung mit dem IHC-Antikörper RBPMS (RNA binding proteins with multiple splicing) wird im Nucleus, im Zytoplasma und perinucleär sichtbar.<sup>9 10</sup> Ob sie auch bestimmte Subpopulationen markieren, ist nicht bewiesen. Die Anzahl der Ganglienzellen in den 4 Quadranten (temporal, superior, nasal, inferior,) der Retina weist nur geringfügige Unterschiede, die nasale Hälfte dennoch eine höhere Summe auf.<sup>11</sup> Die peripheren Anteile der Retina sind jedoch anfälliger gegenüber einem erhöhten IOD als die zentralen Bereiche.<sup>12</sup> Die peripher-inferioren und die peripher-temporalen Bereiche sind sensibler gegenüber glaukomatösen Verletzungen.<sup>13</sup>

## **2.2. Die vom Glaukom betroffenen Anteile des Augapfels**

Der Augapfel (lat. Bulbus oculi) ist ein kugelförmiges Organ, das der visuellen Sinnesaufnahme dient.<sup>14</sup>

Die Augenhöhle (lat. Orbita) ist eine knöcherne Einbuchtung im Schädel zur schützenden Aufnahme des Bulbus oculi. Er liegt dort eingebettet in Fettgewebe.<sup>15 16</sup>

### **2.2.1. Äußere Auge**

Das äußere Auge wird durch die Lider (lat. Palpebrae), die Bindehaut (lat. Konjunktiva), die Hornhaut (lat. Cornea), die Lederhaut (lat. Sklera) sowie die Tränendrüse (lat. Glandula lacrimalis) gebildet.<sup>16</sup>

#### **2.2.1.1. Lederhaut**

Die Lederhaut umgibt den Bulbus innerhalb der Augenhöhle.<sup>15</sup> Im dorsalen Bereich, an der Durchtrittsstelle des N. opticus der Blutgefäße und der sensorischen und motorischen Nerven, bildet sie die Lamina cribrosa. Im anterioren Bereich, im Kammerwinkel, bildet sie den Schlemm-Kanal und das Trabekelwerk.<sup>15 16</sup>

### **2.2.2. Innere Auge**

Das innere Auge besteht aus Vorder- (lat. Camera anterior), Hinterkammer (lat. Camera posterior), Gefäßhaut (lat. Uvea), Regenbogenhaut (lat. Iris), Ziliarkörper (lat. Corpus ciliare), Aderhaut (lat. Choroidea), Linse (lat. Lens), Glaskörper (lat. Corpus vitreosus) und Netzhaut (lat. Retina).<sup>16</sup>

#### **2.2.2.1. Vorderkammer**

Die Vorderkammer wird von dem posterioren Anteil der Hornhaut, der Regenbogenhaut und dem anterioren Anteil der Linse gebildet.<sup>16</sup>

### **2.2.2.2. Hinterkammer**

Die Hinterkammer ist der Bereich, der von der Rückfläche der Regenbogenhaut, der jeweiligen Vorderseite von Linse und Glaskörper, den Zonulafasern und den Ziliarfortsätzen abgeschlossen wird.<sup>16</sup> In der Hinterkammer wird das für die Nährstoffversorgung der Linse und der Hornhaut verantwortliche Kammerwasser gebildet.<sup>16</sup> Es läuft nach Produktion vom Ziliarkörper durch das Trabekelwerk im Kammerwinkel zu 85% in den Schlemmkanal und findet zuletzt Zufluss zum venösen Blut. Zu 15% strömt es über ein uveosklerales Gefäßsystem in die venösen Gefäße.<sup>15 16</sup>

### **2.2.2.3. Ziliarkörper**

Der aus Bindegewebe bestehende Ziliarkörper liegt zwischen dem Ursprung der Regenbogenhaut und der Ora serrata und wechselt dort in die Aderhaut über.<sup>15</sup> Vom Ziliarkörper gehen Ziliarfortsätze ab, die wiederum Zonulafasern abgeben.<sup>14</sup> Diese inserieren an der Linsenhülle und hängen die Linse somit auf.<sup>15</sup> Die Kontraktion des Ziliarmuskels ist für die Akkommodation (Nah- und Ferneinstellung) zuständig.<sup>14 15 16</sup> Durch die Kontraktion kommt es zu einer Entspannung der Ziliarfortsätze mit einer daraus resultierenden Wölbung der Linse mit stärkerer Brechkraft.<sup>16</sup> Das die Hornhaut und Linse ernährende Kammerwasser wird vom Epithel des Ziliarkörpers hergestellt.<sup>15</sup>

### **2.2.2.4. Netzhaut**

Die Netzhaut (lat. Retina) liegt innen dem Augapfel auf und macht die ihn umgebende Hülle komplett.<sup>15</sup> Sie ist der nervale Anteil des Auges und dient der Umwandlung von Licht- in Nervenreize.<sup>15 16</sup>

Die Retina setzt sich aus 10 Schichten zusammen von innen nach außen:

1. Die innere Grenzmembran, Membrana limitans interna, liegt dem Glaskörper nahe und besitzt Fortsätze der Gliazellen, Müller Stützzellen und eine Basalmembran.<sup>14 15</sup>
2. Die Nervenfaserschicht, Stratum neurofibrarum, wird von den Axonen der Ganglienzellen durchzogen.<sup>14</sup>
3. Die Ganglienzellschicht, Stratum ganglionicum, enthält die Zellkörper der Ganglienzellen (3. Neuron).<sup>14</sup>
4. In der inneren plexiformen Schicht, Stratum plexiforme internum, liegen die Dendriten der Ganglienzellen und die Axone der Bipolarzellen, Horizontalzellen und Amakrinzellen sowie diese verbindenden Synapsen. Hier wird das 2. Neuron auf das 3. Neuron verschaltet.<sup>14 15</sup>

5. In der inneren Körnerschicht, Stratum nucleare internum, befinden sich die Zellkerne der Bipolarzellen und Zellkörper der Horizontal- und amakrinen Zellen.<sup>14</sup>
6. In der äußeren plexiformen Schicht, Stratum plexiforme externum, wird das erste auf das zweite Neuron verschaltet. Es befinden sich hier Synapsen, die die Informationen der Axone der Photorezeptoren auf die Dendriten der Bipolarzellen übertragen.<sup>14 15</sup>
7. In der äußeren Körnerschicht, Stratum nucleare externum, kommen die Zellkörper der Stäbchen und Zapfen vor, die das 1. Neuron darstellen.<sup>14 15</sup>
8. Die äußere Grenzmembran, Membrana limitans externa, wird von Zellfortsätzen der Müller-Stützzellen genannten Gliazellen durchdrungen.<sup>14 15</sup>
9. Das Stratum segmentorum externorum et internorum wird von den Außen- und Innensegmenten der Stäbchen und Zapfen durchzogen.<sup>14</sup>
10. Das retinale Pigmentepithel, Stratum pigmentosum retinae, das der Aderhaut fest anliegt, dient dem Stoffübergang zwischen der Aderhaut, den Zapfen und Stäbchen sowie den drei Neuronen. Ebenso sorgt es für die 11-cis-Retinal Wiederherstellung, den Schutz einer Oxidation durch Licht und die Phagozytose von anfallenden Membranbestandteilen.<sup>14</sup>
11. Bruch-Membran (Lamina basilaris der Aderhaut).

Die Schichten von der inneren Grenzmembran bis zur inneren Körnerschicht werden durch die A. centralis retinae aus der A. ophthalmica genährt. Diese tritt mit dem Sehnerv durch die Papilla nervi optici in den Augapfel ein und divergiert anschließend.<sup>15</sup>

Die äußere Retinaschicht bis zum Pigmentepithel wird nur durch Diffusion der Lederhautkapillaren genährt.<sup>15</sup>

Die Macula lutea, auch Gelber Fleck genannt, liegt in der Mitte der Retina, lateral der Papilla nervi optici.<sup>15</sup> In ihrer Mitte liegt die gefäßfreie Fovea centralis retinae. Sie wird auch als Ort des schärfsten Sehens bezeichnet, da sich hier lediglich Zapfen befinden.<sup>15</sup>

Die Bipolarzellen sowie die Ganglienzellen sind dort seitlich verlagert, ebenso die Stäbchen.<sup>15 16</sup> Auf die Zapfen können die Lichtreize dort unmittelbar einfallen und jeder elektrische Impuls eines Zapfens wird auf eine Bipolarzelle und eine Ganglienzelle verschaltet.<sup>15 16</sup> Somit entsteht an dieser Stelle der Retina die größtmögliche Sehschärfe.<sup>14 15</sup>

Die einfallenden Lichtstrahlen außerhalb dieses Areals müssen erst durch die einzelnen Schichten der Retina laufen bis sie an der Schicht der Photopigmente einfallen, um anschließend als elektrische Impulse in die inneren Schichten an die Sehrinde weitergeleitet zu werden.<sup>14 15 16</sup> Zudem werden außerhalb dieses Bereiches viele Zapfen und Stäbchen auf eine Bipolarzelle und eine Ganglienzelle verschaltet, wodurch sich die Sehschärfe vermindert.<sup>14 16</sup> Im Vergleich zu den Zapfen haben die Stäbchen seitlich der Macula die

maximale Dichte.<sup>16</sup> Insgesamt bestehen in der Retina 110 Millionen Stäbchen, 6 Millionen Zapfen und 1 Millionen Ganglienzellen.<sup>16</sup>

Die Retina wird bezogen auf die Lichtempfindlichkeit in den lichtempfindlichen Teil Pars optica retinae und den lichtunempfindlichen Teil Pars caeca retinae unterteilt.<sup>14</sup>

Die Pars optica retinae wird in das außen liegende Stratum pigmentosum mit Pigmentepithelzellen und das sich innen befindende Stratum nervosum mit Photorezeptoren, Nerven und Gliazellen gegliedert. Letzteres ist für die Umwandlung optischer in elektrische Signale zuständig.

Die Pars caeca retinae wird außen durch das Stratum pigmentosum und innen durch das Stratum epitheliale begrenzt.<sup>14</sup>

Der lichtempfindliche Teil, der von der inneren Grenzmembran bis zur Schicht der Stäbchen und Zapfen reicht, liegt der Aderhaut an, während der lichtunempfindliche Teil den Ziliarkörper und die Irishinterfläche bekleidet.<sup>14</sup>

Der Übergang der Pars optica retinae in die Pars caeca retinae im Bereich der Ora serrata ist fließend.<sup>15</sup>

Für den Lichtsinn sind die lichtsensiblen Stäbchen und Zapfen zuständig.<sup>15</sup> Die Zapfen bewirken das photopische Sehen, das farbliche Sehen sowie das Auflösungsvermögen, während die Stäbchen das mesopische und das skotopische Sehen bewirken.<sup>15</sup> Die Stäbchen sind zudem 500 Mal empfindlicher gegenüber Licht als die Zapfen.<sup>15</sup>

Bei den Zapfen wird je nach einfallender Wellenlänge des Lichts zwischen Blau- (440nm), Grün- (540nm) und Rot- (570nm) Zapfen unterschieden.<sup>15</sup>

Bevor elektrische Signale von den Photorezeptoren auf die Neurone verschaltet werden, wird Licht mit einer Wellenlänge von 380-760nm von Sehpigmenten aufgenommen und durch photochemische Reaktionen in elektrische Signale umgewandelt. Diese werden als Aktionspotentiale an die Neurone und schließlich bis zur Sehrinde übertragen.<sup>15</sup>

Signalkaskade:

1. Neuron-Phototransduktion: Einfallendes Licht führt zu einer Isomerisierung des 11-cis-Retinal, wodurch es zu einer Hyperpolarisation der Photorezeptoren mit anschließender Aufhebung der Neurotransmitterfreisetzung kommt.
2. Neuron-Bipolarzellen: Die Signale werden an die Bipolarzellen vermittelt, dass keine Neurotransmitter freigesetzt werden
3. Neuron-Ganglienzellen: Sie liegen im Stratum ganglionicum. Die Axone laufen unmyelinisiert bis zum Discus nervi optici im Stratum neurofibrarum. Sie verlassen die Orbita



durch die Papilla nervi optici und laufen dann myelinisiert im N. opticus zum Corpus geniculatum und zur Sehrinde.

Da sich an dem Austrittspunkt des N. opticus keine Photorezeptoren befinden, wird an dieser Stelle auch von dem blinden Fleck gesprochen.<sup>14</sup>

## **2.3. Das Glaukom**

### **2.3.1. Definition**

Das Glaukom umfasst eine Gruppe von Augenerkrankungen, die mit einer irreversiblen progredienten Degeneration der neuronalen Fasern des N. opticus, einem Zelltod der retinalen Ganglien und der Exkavation des Sehnervenkopfes einhergeht.<sup>1 5</sup>

Diese Optikusneuropathien sind durch Gesichtsfeldausfälle und irreversible Erblindung gekennzeichnet.<sup>5 17</sup>

### **2.3.2. Epidemiologie**

Das Glaukom ist weltweit eine der führenden Ursachen für irreversible Erblindung.<sup>18</sup> Die Prävalenz des Glaukoms in Europa lag 2013 in der Altersgruppe der 40-80-Jährigen bei 2,93%, während es bei den über 90-Jährigen sogar 10% waren.<sup>1 6</sup> Die weltweite Prävalenz des Glaukoms lag bei 3,54% der 40-80-Jährigen.<sup>6</sup> Dabei sind weltweit, europaweit und deutschlandweit mehr Patienten von einem Offenwinkelglaukom betroffen.<sup>1 6 19</sup>

Männer zeigen ein höheres Risiko an einem Glaukom zu erkranken als Frauen.<sup>20</sup> Bezogen auf die Rasse zeigt die schwarze Bevölkerungsgruppe eine höhere Prävalenz als die Weiße.<sup>21</sup>

### **2.3.3. Symptome**

Je nach Glaukomform unterscheiden sich die symptomatischen Befunde bei den Betroffenen. Patienten mit einem primären Offenwinkelglaukom (POWG) berichten über wenige Symptome bis hin zu keinen Symptomen im frühen Stadium.<sup>18 22</sup> Untersuchungen zeigen, dass einige Patienten ein unscharfes Sehen angeben.<sup>22</sup> Viele dieser Patienten sind sich jedoch nicht bewusst, dass sie an einem Glaukom erkrankt sind.<sup>23 24</sup> Erst im fortgeschrittenen Stadium zeigen sich Symptome eines Sehkraftverlustes und Gesichtsfeldausfälle.<sup>18</sup> Da die Krankheit behandelt werden kann, jedoch eine irreversible Blindheit die Folge der Erkrankung ist, ist es umso wichtiger die Pathogenese zu verstehen,

um ein Glaukom frühzeitig erkennen zu können. Ein akutes Winkelblockglaukom zeichnet sich im Vergleich zum POWG durch Schmerzen aus. Schmerzen an den Augen, wobei die Augen oft als sehr hart empfunden werden, begleitet von verschwommener Sicht und Übelkeit sind klassische Symptome eines akut zu behandelnden Notfalls.<sup>1</sup> Der Gesichtsfeldverlust kann dazu führen, dass die sehbezogene Lebensqualität der Betroffenen stark beeinträchtigt wird.<sup>25</sup> Da sie Handlungen des täglichen Lebens wie Lesen, sicheres Gehen und Autofahren nicht mehr oder nur eingeschränkt nachkommen können, steigt die psychische Belastung dieser Bevölkerungsgruppe.<sup>26 25 27</sup> Auch wenn diese Faktoren zusätzlich vom Lebensalter abhängig sind, tragen sie zur Entwicklung einer Depression unter Glaukomekranken bei.<sup>25 27</sup>

#### **2.3.4. Risikofaktoren**

Es gibt eine Reihe von Risikofaktoren, die Einfluss auf die Entstehung eines Glaukoms haben. Neben Menschen mit einer Myopie und einer auffälligen Familienanamnese sind besonders ältere Menschen gefährdet zu erkranken.<sup>6 28</sup>

Neben den genannten Risikofaktoren stellt ein erhöhter IOD jedoch den klinisch Wichtigsten dar, da dieser der einzige zu beeinflussende Faktor für ein POWG ist.<sup>1 2 29 30 31</sup> Die schwarze Bevölkerungsgruppe zeigt eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber einer glaukomatösen Erkrankung, besonders des POWGs.<sup>6 21</sup> Asien zeigt eine erhöhte Prävalenz des primären Engwinkelglaukoms.<sup>6</sup> Den höchsten Anstieg der Prävalenz mit dem Alter zeigen die Weißen.<sup>21</sup> Dies lässt auf ein unterschiedliches Risiko in Abhängigkeit der ethnischen Rasse und des Alters schließen.<sup>6 21</sup> Darüber hinaus hat sich das männliche Geschlecht als potentieller Risikofaktor für ein Glaukom, besonders für ein POWG erwiesen.<sup>6 21 28</sup> Ein weiterer bekannter pathogenetischer Faktor ist Diabetes mellitus.<sup>32</sup> Jedoch wurde für diese Patientengruppe nun ein Rückgang des Risikos für ein Offenwinkelglaukom festgestellt.<sup>33</sup>

Einen Zusammenhang zwischen Patienten mit der Diagnose obstruktives Schlafapnoesyndrom und einer glaukomatösen Erkrankung bestätigen einige Untersuchungen im Hinblick auf Prävalenz und potentielltem Risiko.<sup>34</sup>

Obwohl die Behandlung des Risikofaktors Hypertonie das Risiko für die Erkrankung an einem Glaukom senken sollte, zeigen bestimmte Hypertoniemedikamente ebenfalls Nebenwirkungen.<sup>24</sup> Alpha-Antagonisten erwiesen sich als nachteilig und bergen das Risiko ein Glaukom zu entwickeln.<sup>35 29</sup>

Eine Besonderheit einiger neurodegenerativer Krankheiten ist das Vorhandensein von oxidativem Stress.<sup>36</sup> Dieser hat Auswirkungen auf die Entstehung eines Glaukoms, vor allem die Schädigung der RGCs.<sup>2</sup> Dass vaskuläre Dysfunktionen der retinalen Arteriolen durch einen erhöhten IOD entstehen und diese einen Anstieg von ROS hervorrufen, zeigt die

Relevanz der Untersuchung des oxidativen Stresses in Bezug auf das Glaukom.<sup>3</sup> Oxidativer Stress zeigt beim Untergang von Endothelzellen eine stärkere Bedeutung als ein erhöhter Druck.<sup>4</sup> Daraus folgend ist es umso wichtiger die Auswirkungen auf neuronale Zellen und Fasern zu erforschen.

### **2.3.5. Pathophysiologie**

Die Pathophysiologie des Glaukoms ist noch nicht eindeutig erforscht und erscheint multifaktoriell bedingt zu sein. Eine zentrale Rolle bei der Pathophysiologie nimmt der Augeninnendruck ein. Ist dieser erhöht und liegt ein erniedrigter Perfusionsdruck im Gewebe vor, kommt es zu einer Verschiebung der Lamellenblätter der Lamina cribrosa.<sup>1 37</sup>

Da die Sehnervenfasern durch die Lamina cribrosa laufen, kommt es zu einem mechanischen Stress, einer eingeschränkten axonalen Signalkaskade und einer eingeschränkten Blutversorgung.<sup>37 38 39</sup>

Auch wenn ein erhöhter IOD eine wichtige klinische Manifestation des Glaukoms darstellt, ist er bei einigen Patienten unauffällig.<sup>40</sup>

Eine Behandlung, in der der IOD um 25% gesenkt wird, vermindert ein Voranschreiten des Glaukoms um 50%.<sup>41</sup> Dies zeigt, wie essenziell sich eine Drucksenkung aufweist, um die Empfindlichkeit am Sehnervenkopf zu verringern.

Nach der Gefäßtheorie kommt es durch einen erhöhten IOD zu vaskulären Abnormitäten. Ein erhöhter IOD führt somit neben mechanischem Stress zusätzlich zu vaskulären Dysfunktionen, wodurch erhöhte ROS-Konzentrationen auftreten.<sup>3</sup> Studien zeigen, dass vaskuläre Modifikationen Einfluss auf die Pathophysiologie, vor allem auf das Normaldruckglaukom haben.<sup>40</sup> So spielt ein erhöhter Druckgradient in der Lamina cribrosa durch einen erniedrigten Liquordruck im Subarachnoidalraum des N. opticus eine gesonderte Rolle beim Normaldruckglaukom.<sup>42</sup> Ein nächtlich stark erniedrigter Blutdruck sei ebenfalls zu beachten.<sup>43</sup>

Mitochondriale Dysfunktionen führen ebenfalls zu einer erhöhten Konzentration an ROS und somit auch zu einem oxidativen Stress, der beim Glaukom entsteht.<sup>44</sup>

Durch diese umfangreiche Pathophysiologie mit vielen Angriffspunkten können daraus folgend auch verschiedene RGCs unterschiedlich auf äußere Angriffe reagieren.

### 2.3.6. Einteilung

Generell kann in primäre und sekundäre Glaukome differenziert werden. Während die sekundären Glaukome infolge einer andersartigen ophthalmologischen Erkrankung oder medikamentös bedingten Nebenwirkungen aufkommen, sind die primären Glaukome die direkte Auswirkung der glaukomatösen Ätiopathogenese und das Ergebnis pathophysiologisch bedingter Ungleichgewichte.<sup>15</sup>

Bezogen auf anatomische Abweichungen im Bereich des Kammerwinkels können das Offenwinkel- und das Engwinkelglaukom eingeteilt werden.

Das Kammerwasser fließt aus der Hinterkammer in die Vorderkammer und muss dazu einen physiologischen Druck von ca. 16mmHg aufbringen, um den physiologischen ersten Widerstand zu überwinden.<sup>15 45</sup> Dieser ist bei dem Offenwinkelglaukom im Normbereich und der Kammerwinkel ist physiologisch offen. Jedoch kommt es im Trabekelwerk zu einem zweiten Widerstand, der beim Offenwinkelglaukom erhöht ist.

Beim Engwinkelglaukom besteht ein erhöhter erster Widerstand. Dieser muss durch eine Erhöhung des Drucks durch Kammerwasseransammlung in der Hinterkammer bewältigt werden. Schließlich führt dies zu einer Vorstülpung der Iris. Diese pathologische Situation verschließt das Trabekelwerk. Das Kammerwasser kann somit nicht abfließen und es kommt zu einer Erhöhung des IODs.

Ein sekundäres Offenwinkelglaukom ist zum Beispiel das Pigmentdispersionsglaukom. Hier lagern sich Pigmentanteile der Iris nach Ablösung im Trabekelwerk ab. Dadurch kommt es hier zu einer Abflussbehinderung des Kammerwassers.

Ein sekundäres Engwinkelglaukom kann sich zum Beispiel durch eine Rubeosis iridis ausbilden. Die Ursache liegt hier nicht an einem erhöhten Widerstand der Pupille, der überwunden werden muss und infolgedessen sich die Iris vor das Trabekelwerk stülpt. Das Trabekelwerk wird anderweitig verlegt. Im Falle der Rubeosis iridis durch neugebildete Gefäße.

Einen absoluten Notfall stellt das primär akute Winkelblockglaukom dar.<sup>15</sup> Hierbei entsteht ein IOD, der anfallsartig auf Drücke von 50-80mmHg steigt.<sup>46</sup> Besonders Patienten mit einer flachen Vorderkammer sind hierfür anfällig.<sup>15</sup>

Eine weitere Einteilung anhand des Augeninnendrucks unterscheidet zwei weitere Glaukomformen. Es kann zwischen dem Normaldruck- und Hochdruckglaukom differenziert werden.<sup>15</sup> Der physiologische Augeninnendruck liegt bei 16 +/-5mmHg.<sup>45</sup> Beim Normaldruckglaukom spielt ein erhöhter Druck somit keine Rolle im Gegensatz zum Hochdruckglaukom. Von einem Hochdruck wird ab einem Wert von 22mmHg gesprochen.<sup>15</sup>

<sup>47</sup> Auch wenn Erwachsene am häufigsten betroffen sind, tritt das Glaukom auch bei

Säuglingen und Kleinkindern auf. Das kongenitale Glaukom liegt bereits bei der Geburt vor und wird autosomal rezessiv vererbt, vor allem bei Säuglingen männlichen Geschlechts.

Das infantile Glaukom tritt in den ersten Lebensjahren auf und äußert sich durch einen erhöhten IOD, der für eine sich ausdehnende Bulbushülle sorgt. Das Auge wird dadurch sehr groß, vor allem die Hornhaut.<sup>15</sup>

### **2.3.7. Diagnostik**

#### Tonometrie

Die Tonometrie dient der Ermittlung des IODs. Die Palpation der Augäpfel im Vergleich zueinander lässt bezogen auf die Eindrückbarkeit eine grobe Einschätzung eines erhöhten IODs zu. Sie ist jedoch nicht zuverlässig genug, um auf weitere diagnostische Verfahren zu verzichten. Die Tonometrie wird daher zur Diagnostik eines Glaukoms routinemäßig eingesetzt.

Es gibt verschiedene Anwendungsmethoden in der Tonometrie. Das weitverbreitetste Verfahren ist das Verfahren nach Goldmann. Hierbei handelt es sich um eine Applanationstonometrie. Der Patient wird sitzend untersucht, indem ein kegelförmiger Druckkörper auf der Hornhaut adaptiert wird. Der aufgewendete Druck zum abplatteln der Hornhaut kann näherungsweise dem IOD gleichgesetzt werden.

Neben diesem bestehen noch andere Verfahren der Tonometrie. Hier sei die Non-Contact Tonometrie und die Rebound-Tonometrie zu erwähnen. Die Non-Contact Tonometrie funktioniert über einen Luftstoß, der eine Hornhautabflachung bewirkt, die von dem Tonometer gemessen wird. Aus dem Verformungsgrad kann der IOD einigermaßen bestimmt werden.

Die Rebound-Tonometrie beruht auf der Erfassung der Rückstellungskräfte der Hornhaut. Anhand dieser kann der IOD bestimmt werden. Dazu wird eine Kugel gegen die Hornhaut geschossen.<sup>15</sup>

#### Ophthalmoskopie

Die Ophthalmoskopie dient der Untersuchung des Augenfundus. Hier unterscheiden sich die direkte und die indirekte Variante. Bei Letzterem wird über eine vor das Auge gehaltene Linse der dadurch vergrößerte Augenfundus mit der Spaltlampe untersucht. Dabei entsteht eine 2-6-fach vergrößerte seitenverkehrte Anschauung des gesamten Augenfundus. Der Augenfundus kann hierdurch besonders auf Netzhautdefekte und eine abnorme Papillenexkavation analysiert werden. Die Größe der Exkavation lässt nicht automatisch auf eine glaukomatöse Veränderung schließen. Wichtig ist die Inspektion der physiologischen

gelborangen Papillenfarbe, die eindeutige Begrenzung der Papille zur Retina sowie deren runde Ausformung. Die im Zentrum der Papille gelegene Exkavation des Sehnervs ist abhängig vom Durchmesser der Papille (Exkavations-Papillen-Verhältnis). Gibt es Differenzen in diesem Verhältnis, lässt sich dieser Befund einem Untergang von Nervenfasern zuordnen.

Bei der direkten Variante wird der Augenfundus mit einem Ophthalmoskop untersucht. Hierbei entsteht eine 16-fache nicht seitenverkehrte Vergrößerung. Durch die starke Vergrößerung können kleinste Auffälligkeiten diagnostiziert werden, jedoch kann nur ein kleiner Ausschnitt des Augenfundus beurteilt werden.<sup>15</sup>

### Perimetrie

Die Perimetrie dient der Analyse des Gesichtsfeldes. Das Gesichtsfeld beschreibt den Bereich der visuellen Sinnesaufnahme bei einem Geradeausblick. Dabei soll der Patient einen Knopf betätigen sobald er einen Lichtpunkt in seinem Gesichtsfeld wahrnehmen kann. Hierzu wird der Patient mit einem kinetischen oder statischen Perimeter untersucht. Die kinetische Variante funktioniert mit sich bewegenden und von der Peripherie dem Zentrum des Gesichtsfeldes nähernden Lichtpunkten, die sich in Ihrer Helligkeit und Größe unterscheiden. Bei der statischen Perimetrie werden unbewegte Lichtpunkte von peripher nach zentral in der Helligkeit gesteigert bis sie registriert werden.<sup>15</sup>

### Untersuchung Vorderkammer

Zur Beurteilung der Vorderkammertiefe ist deren Ausleuchtung essenziell. Befundet man hierbei eine gleichmäßige Ausleuchtung der Iris, deutet dies auf eine tiefe Vorderkammer hin. Bei partieller Ausleuchtung der Iris lässt dies auf eine flache Vorderkammer deuten.

Eine weitere Methode ist die Spaltlampenuntersuchung. Sie dient der Begutachtung der Vorderkammertiefe unter Berücksichtigung der Hornhautdicke.

Bei auffälligen Befunden sollte die weitere Diagnostik durch eine Gonioskopie oder eine optische Kohärenztomographie (OCT) erfolgen, mit derer die Kammerwinkelanatomie eindeutig befundet werden kann.<sup>15</sup>

## **2.3.8. Therapie**

### Medikamentöse Therapie

Zur Auswahl stehen unterschiedliche Wirkstoffklassen, die anfangs jeweils vor allem als alleinige Therapie zur lokalen Medikation verschrieben werden sollten. Dazu zählen vor allem Präparate zur lokalen Anwendung. Bei unzureichender Drucksenkung kann eine

Doppelmedikation in Erwägung gezogen werden. Kombinationspräparate bieten hierbei einen entscheidenden Vorteil, da sie auch von Patienten mit geringer Compliance akzeptiert werden.

### Alpha-2-Agonisten

Die Substanzen dieser Wirkstoffgruppe bewirken je nach Präparat über unterschiedliche Weise einen Druckabbau.

Sie induzieren eine Reduktion des Augeninnendrucks über eine Vasokonstriktion der bulbären Gefäße, über eine verminderte Produktion des Kammerwassers oder über dessen verbesserten Abfluss.

### Beta-Rezeptor-Blocker

Die Beta-Rezeptor-Blocker greifen am Epithel des Ziliarkörpers an. Sie drosseln die Bildung des Kammerwassers und tragen somit zu einer Senkung des Augeninnendrucks bei. Jedoch besteht das Risiko einer systemischen Wirkung.

### Miotika

Arzneimittel dieser Gruppe zielen auf den M. ciliaris und die Muskeln der Pupille. Beim primär chronischen Offenwinkelglaukom wird durch die Steigerung der Muskelaktivität des M. ciliaris das Trabekelwerk schließlich geweitet. Dadurch wird der Abfluss des Kammerwassers gefördert.

### Prostaglandine

Die Wirkung der Prostaglandinderivate äußert sich in einer gesteigerten Abflussrate des Kammerwassers. Sie werden hauptsächlich zur Therapie des POWG verschrieben und können eine außerordentlich hohe Erniedrigung des Drucks erzielen. Ferner haben sie nur sehr geringe systemische Nebenwirkungen.<sup>15</sup> Sie sind die effektivsten Drucksenker.<sup>48</sup>

### Carboanhydrasehemmer

Die Carboanhydrase ist physiologischerweise an der Produktion des Kammerwassers beteiligt. Durch Hemmung dieses Enzyms wird die Produktion eingeschränkt, was eine Druckminderung zur Folge hat. Neben dieser Funktion erhöhen Präparate dieser Wirkstoffklasse den lokalen Blutdurchfluss. Hierdurch bedingt werden Carboanhydrasehemmer hauptsächlich bei akuten Glaukomen verschrieben.

## Osmotika

Diese Präparatgruppe beruht auf osmotischen Vorgängen. Die zugeführte hyperosmolare Medikation durch Mannit führt zu einer Diffusion von Flüssigkeit aus dem Glaskörper und dem Kammerwasser.

Auf operative Methoden wird eingegangen, wenn Medikamentenwirkungen nicht befriedigend oder nicht bekömmlich sind oder die Medikamenteneinnahme im Alltag nicht umgesetzt werden kann.

Hierbei sind die Möglichkeiten der Lasertrabekuloplastik und der Stentimplantation gegeben. Ebenso stellen filtrierende Eingriffe eine operative Maßnahme dar.<sup>15</sup>

Die medikamentöse Begleitung bei operativen Eingriffen mindert das Risiko von Druckerhöhungen.<sup>48</sup>

### **2.3.9. RGC-Subpopulationen: Morphologie, Differenzierung und Identifizierung**

#### **2.3.9.1. RGC-Morphologie und Strukturähnlichkeiten zu anderen Zellen**

Die retinalen Ganglienzellen sind Nervenzellen des Auges, die aus einem Soma mit einem Axon und Dendriten bestehen.<sup>14</sup> Die Ganglienzellen weisen einen größeren Durchmesser auf als andere Zellen ähnlicher Struktur.<sup>14 49</sup> Die Ganglienzellen sind in der Retina mit anderen Zellen ähnlicher Struktur direkt verbunden oder in nächster Nähe gelegen:

Amakrinzellen bestehen wie die RGCs aus einem Soma, sind jedoch stark verzweigt und besitzen nur Dendriten und kein Axon.<sup>14</sup>

Die Bipolarzellen weisen ebenfalls ein Soma auf, haben jedoch nur ein Axon und einen Dendriten.<sup>14</sup>

Die Astrozyten gehören zu den Gliazellen, die einem Stern ähneln. Sie besitzen ein Soma und verzweigte Fortsätze.<sup>14</sup>

Auch wenn sich die Zellen untereinander morphologisch nur ähneln, erschwert dies eine Differenzierung bei Zählprozessen mit gleichzeitiger Anfärbung.



### **2.3.9.2. RGC-Subpopulationen bei Menschen und Nagetieren**

RGCs können nach morphologischen und funktionellen Kriterien eingeteilt werden. Die Identifizierung von RGCs kann auch nach Färbungen wie Nucleus- und Zytoplasmafärbung erfolgen.<sup>10 50</sup>

Betrachtet man die Morphologie, können M- (magnozelluläre-) und P- (parvozelluläre-) RGCs beim Menschen unterschieden werden. Die M-RGCs sind größer als die P-RGCs und unterscheiden sich in ihrer Funktion. Während die M-RGCs Bewegungen erkennen, können die P-RGCs Formen und Farben wahrnehmen.<sup>14</sup> Bei Nagetieren wird hier von alpha-RGCs gesprochen.<sup>51</sup> Anhand der Größe des Somas und der Dendriten können A-, B- und C-RGCs unterschieden werden. Die RGCs vom Typ A, auch alpha-RGCs genannt, stellen die morphologisch größte und am meisten untersuchte RGC-Subpopulation dar.<sup>52</sup> Funktionell können die oben genannten Zellen nun noch nach ON-Zentrum und OFF-Zentrum Zellen differenziert werden. Bei Lichteinfall auf das jeweilige rezeptive Feld werden sie gehemmt (OFF) oder erregt (ON).<sup>14</sup> Die alpha-RGCs können nochmals in vorübergehend (transient) ON-t/OFF-t RGCs und dauerhaft (sustained) ON-s/OFF-s RGCs unterteilt werden.<sup>52</sup>

Ein weiterer Subtyp sind die ip-RGCs (intrinsisch photosensitiv). Sie werden auch zu den Photorezeptoren gezählt, da sie eigenständig lichtempfindlich sind. Die ip-RGCs werden anhand ihrer Morphologie weiter in M1-M6 unterteilt.<sup>53</sup> Weitere Autoren berichten über die Vermutung von 30-RGC-Typen.<sup>54</sup> Diese Vermutung macht es schwierig die einzelnen Subtypen individuell in ihrer Morphologie, Funktion, Topographie und Anzahl zu identifizieren. Es wurde bereits herausgefunden, dass die M4 ip-RGCs die ON-s RGCs darstellen, diese eine gewisse Resistenz gegenüber retinalen Verletzungen aufweisen und die alpha-RGCs in ihren weiteren Untergruppen unterschiedlich topographisch verteilt sind. So sind sie temporal in höherem Maße vertreten, während die ON-s und OFF-s RGCs eher peripher und die ON-t und OFF-t RGCs zentral gelegen sind.<sup>52</sup>

### **2.3.9.3. Immunhistochemische Färbung**

#### **2.3.9.3.1. Technik**

Um zu untersuchende Zellen eindeutig zu identifizieren, gibt es unterschiedliche Vorgehensweisen. Die immunhistochemische Färbung ist hierbei eine in der Forschung bewährte Technik zur Visualisierung von Zellen bzw. Geweben. Die Technik basiert auf mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten Antikörpern, die an Epitope der zu suchenden Zellen, hier explizit der RGCs binden. Durch die Fluoreszenz kann die Verbindung zum Epitop und somit die Identifizierung der Zelle dargestellt werden.<sup>55</sup> Da es viele unterschiedliche Epitope zur

Darstellung unterschiedlicher Zellanteile und somit möglicherweise auch von diversen Zellsubpopulationen gibt, werden in der Regel verschiedene IHC-Färbungen innerhalb eines Projektes miteinander verglichen.<sup>52</sup>

Es gibt die direkte und die indirekte IHC-Färbung. Bei der direkten Färbung ist der primäre Antikörper mit einem fluoreszierenden Farbstoff verbunden. Bei der indirekten Färbung wird neben dem primären Antikörper ein sekundärer Antikörper verwendet, der mit einem Fluoreszenzfarbstoff verbunden ist und an den primären Antikörper bindet. Dadurch kommt es zu einer Antigen-Antikörper-Reaktion.<sup>55</sup>

Jedoch gibt es Antikörper, die nicht nur explizit RGCs identifizieren, sondern auch andere Zellen.<sup>56 57</sup> Wenn sich diese dann auch morphologisch noch sehr ähnlich sind, erschwert dies die Identifikation der zu untersuchenden Zellen.<sup>49 14</sup> Durch verdrängte Amakrinzellen in die GCL (Ganglienzellschicht) ist hier oftmals das Problem der eindeutigen Identifizierung der RGCs gegeben.<sup>56 57</sup> Vor allem Astrozyten und amakrine Zellen können Zählungen beeinträchtigen.<sup>57</sup>

### **2.3.9.3.2. IHC-RGC-Marker**

#### Brn3a

Brn3a ist ein Transkriptionsfaktor der Brn3-Familie, die an der Entwicklung der RGCs beteiligt sind.<sup>57 58</sup> Brn3a markiert 96% der Brn3 positiven (+) Zellen und 80-90% der rückmarkierten RGCs mit Fluorogold (FG).<sup>9 59 60 61 62</sup> Brn3a markiert jedoch keine amakrinen Zellen, Makrophagen und Astrozyten.<sup>61</sup> Da Brn3a auf den Nucleus beschränkt ist, wird die Färbung auch Nucleusfärbung genannt.<sup>10 50</sup> Brn3a markiert keine ip-RGCs, wodurch es zum Ausschluss dieser RGC-Subtypen kommt.<sup>57</sup> Dies ist je nach Untersuchung essenziell zu wissen, da nach ONC (optic nerve crush) die ip-RGCs überleben, aber dies nicht mit Brn3a darstellbar ist, weil diese nicht angefärbt werden.<sup>57</sup> Bezogen auf die alpha-RGCs sei zu beachten, dass ON-RGCs nicht identifizierbar sind, jedoch OFF-RGCs.<sup>63</sup>

Es wird über einen progressiven Zusammenhang des Rückgangs der Brn3a-Expression unter Druckerhöhung berichtet, jedoch ebenfalls über einen vorzeitigen Rückgang der Brn3a-Expression unter Druckerhöhung vor dem eigentlichen RGC-Tod.<sup>9 59 64 65</sup> Diese Annahmen können zu falschen Interpretationen von Ergebnissen führen. Dies gilt ebenso für die Expression unter Stress.<sup>50</sup>

Es gibt jedoch auch Studien, die von der Expression unter Druck genau das Gegenteil berichten.<sup>66</sup> Somit ist nicht eindeutig, wie sich Brn3a definitiv unter bestimmten Bedingungen verhält. Er wird dennoch gerne präferiert und als zuverlässiger Marker zur Beurteilung von RGCs eingesetzt.<sup>9 58 67</sup> Brn3a zeigt ein rückläufiges Muster nach Verletzungen.<sup>57</sup>

## RBPMS

RBPMS ist ein Protein, welches die mRNA nach der Transkription modifiziert.<sup>10 57</sup> RBPMS wird als zytoplasmatische Färbung bezeichnet.<sup>10 50</sup> RBPMS ist aber auch im Kern lokalisiert.<sup>10 57</sup> Mead et al. berichten, dass RBPMS hauptsächlich im Kern, aber nicht ausschließlich dort lokalisiert ist.<sup>57</sup>

Die Rückmarkierung mit FG zeigt, dass 99,5% der FG+ RGCs auch RBPMS+ sind.<sup>10</sup> Im Vergleich exprimieren RBPMS+ Zellen nur zu 80% Brn3a.<sup>60</sup> Dies stimmt mit der Aussage überein, dass Brn3a nur 80% der RGCs markiert, während RBPMS alle Subtypen aber keine verdrängten amakrinen Zellen markiert.<sup>50 60</sup> Somit scheint RBPMS Subpopulationen zu markieren, die Brn3a nicht markiert. Diese könnten ip-RGCs sein, jedoch nicht ausschließlich.<sup>60</sup> RBPMS scheint somit ein zuverlässiger und bevorzugter Marker zur Quantifizierung der RGCs zu sein.<sup>60 57</sup>

RBPMS besitzt die Fähigkeit der Markierung von lebenden und lädierten RGCs nach ONC und okulärer Hypertension.<sup>57</sup>

## βIII-Tubulin

β-Tubulin ist ein Protein, welches sich in Neuronen befindet.<sup>68 58</sup> Es ist wie Brn3a und RBPMS ein Marker zur Identifizierung von RGCs.<sup>58</sup> βIII-Tubulin markiert jedoch nicht ausschließlich RGCs. Es wurden ebenso amakrine Zellen, Horizontalzellen und Photorezeptoren gefärbt, welche die Zellzahl der zu untersuchenden RGCs verfälschen können.<sup>56</sup> Es ist bekannt, dass das Protein unter Druck nicht herunterreguliert wird.<sup>69</sup> Nichtsdestotrotz wird βIII-Tubulin als zuverlässiger IHC-Marker verwendet.<sup>56 57</sup> Im Vergleich mit FG markierten RGCs entsprachen die mit dem βIII-Tubulin-Antikörper gefärbten RGCs weitestgehend den als RGCs identifizierten FG+ Zellen.<sup>69</sup>

## γ-Synuclein

Synucleine sind Proteine, die in diversen Geweben, davon u.a. in der Retina vorkommen. γ-Synuclein ist in der GCL, genauer gesagt im Zytoplasma der RGCs, exprimiert. Ebenso kommt es in der RNFL (retinale Nervenfaserschicht) vor. Die Zahlen der mit γ-Synuclein markierten RGCs in unbeschädigten Retinae stimmen weitestgehend mit den Zahlen der RGC-Färbung durch Brn3a überein. Jedoch gibt es Hinweise, dass auch dieser Antikörper weitere Zellen markiert, die keine RGCs darstellen. Unter okulärer Hypertension zeigte sich eine verzögerte Herabregulierung der RGCs unter γ-Synuclein im Vergleich zu den mit Brn3a markierten RGCs. Dies ist der gleichzeitigen Markierung von verdrängten amakrinen Zellen geschuldet.<sup>57</sup>

## Thy-1

Thy-1 ist ein auf Zelloberflächen von RGCs gelegenes Immunglobulin. Es befindet sich jedoch auch auf Fibroblasten und amakrinen Zellen. Verglichen mit anderen Färbungen sind nur 84% der Thy-1 Zellen RBPMS+ und nur 61% Brn3a+. Diese Differenz lässt auf die Färbung von amakrinen Zellen und ip-RGCs schließen, die durch Thy-1 markiert werden. Ebenso wird über eine Herabregulierung des Immunglobulins unter okulärer Hypertension vor dem RGC-Tod berichtet, wodurch die Sicherheit und Zuverlässigkeit des Markers infrage gestellt wird.<sup>57</sup>

## Neurofilament-H

Neurofilament-H ist ein Antikörper, der auf den Neurofilamentproteinen ein nicht-phosphoryliertes Epitop besetzt. Dieses befindet sich auf den mittel- und hochmolekularen Untereinheiten der Neurofilamentproteine.<sup>70</sup> Die Neurofilamentproteine befinden sich im Zytoplasma und in Axonen der RGCs.<sup>71</sup> Es wird zur Identifikation von alpha-RGCs sowie RGC-Axonen verwendet.<sup>72</sup> Das Protein wurde jedoch auch in Horizontalzellen nachgewiesen.<sup>71</sup>

## **2.4. Fragestellungen und Ziel der Arbeit**

Das Glaukom wird oftmals mit einem erhöhten IOD in Zusammenhang gebracht.<sup>15</sup> Jedoch gibt es auch andere pathologische Vorgänge, die an der Pathogenese beteiligt sind.<sup>44</sup> So muss es beim Normaldruckglaukom Vorgänge geben, die unabhängig vom Druck entstehen. Unter anderem spielt der oxidative Stress eine gesonderte Rolle.<sup>3</sup> Es gibt Ergebnisse, dass der oxidative Stress Einfluss auf die Endothelzellen und Arteriolen hat. Es ist bekannt, dass es zu einem Untergang der Endothelzellen durch oxidativen Stress aber nicht durch einen erhöhten IOD kommt.<sup>4</sup> Bezogen auf RGCs und deren Axone fehlen hier bisher noch Forschungsvorhaben. Ebenso ist fraglich, welche Anteile der RGCs unter oxidativem Stress und erhöhtem IOD genau betroffen sind. Ob sie in allen Bereichen der Retina gleichmäßig verschwinden und ob es altersbedingte Unterschiede gibt, ist ebenfalls nicht geklärt.

Wir möchten herausfinden, ob es Unterschiede im Muster der RGC-Apoptose zwischen oxidativem Stress und erhöhtem IOD gibt.

Hierzu untersuchen wir, ob es zur Degeneration von unterschiedlichen Zellanteilen der RGCs beim oxidativen Stress kommt und ob es lokalisierte oder generalisierte Zelluntergänge zwischen den Testgruppen gibt. Ebenso möchten wir das Muster der Degeneration der Zellanteile der RGCs unter erhöhtem IOD untersuchen. Wir betrachten hierbei den Nucleus, das Zytoplasma und die Axone der RGCs.

Um unser Ziel zu erreichen, wenden wir ein experimentelles Glaukommodell mit unterschiedlichen IHC-Färbungen an.

Durch die Beantwortung unserer Frage kann die Diagnostik und somit die Therapie des jeweiligen Glaukomtypen optimiert werden. Zudem können pathophysiologische Vorgänge in Zusammenhang gebracht werden

### **3. Material und Methoden**

Im Rahmen dieser Dissertation wurde ein experimentelles Glaukommodell untersucht.

#### **3.1. Material**

Es wurden die Retinae (n=19) von Mäusen unterschiedlichen Alters (12-18 Wochen) und unterschiedlichen Geschlechts des Stammes C57BL-6J aus den Charles River Laboratories untersucht. Dies ist ein Inzuchtstamm, von dem alle Tiere genetisch identisch und Forschungsergebnisse somit von unterschiedlichen Tieren dieses Stammes vergleichbar sind.

#### **3.2. Methoden**

##### **3.2.1. Vorbereitungen experimentelles Glaukommodell**

###### Tiere

Die Experimente wurden an n = 19 gemischtgeschlechtlichen C57BL-6J Mäuseaugen durchgeführt, die gemäß internationalem ARVO-Standard (ARVO: Association for Research Vision in Ophthalmology) in einem Tierkäfig mit 12-stündigem Tag-und-Nacht-Rhythmus mit freiem Zugang zu artgerechter Nahrung und Wasser gehalten wurden. Die Ernährung erfolgte mit einer ad libitum-Diät aus Phytoöstrogen-freien Nagetier-Standarddiät (Altromin 1314; 59 % Kohlenhydrate, 27 % Protein, 14 % Fett) und angesäuertem Wasser. Insbesondere wurde ein Beleuchtungsniveau von  $39 \pm 7$  Lux verwendet, um die negativen Auswirkungen der Standard-Feeder-Beleuchtung auf die Retina älterer Tiere zu optimieren. Alle Mäuse wurden unter spezifischen pathogenfreien Bedingungen in individuell belüfteten Käfigsystemen (IVC) (GM 500, Tecniplast® Greenline) mit einer maximalen Käfigdichte von fünf Mäusen pro Käfig gehalten.

Die Versuchstiere wurden täglich von geschultem Personal des dezentralen Tierhaltungsnetzwerkes der Uniklinik Köln auf ihr Wohlbefinden kontrolliert. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf pathologische Veränderungen an den Augen wie Rötungen, Trübungen und Schwellungen gerichtet.

Der Tierversuch wurde zuvor vom LANUV (Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen) mit der Uni Köln Anzeige§4.21.003 unter der Verantwortung von Prof. Dr. Verena Prokosch-Willing für das entsprechende Versuchsvorhaben genehmigt. Kurz vor dem Beginn des Sezierens wurden die Mäuse durch

zervikale Dislokation getötet. Im Rahmen dieser Arbeit wurden für die In-vitro-Versuche auf RGC-Apoptose Mäuse benötigt.

### Enukleation und Markierung des Bulbus

Vor der Entnahme des Bulbus mit einer anatomischen Pinzette wurde mit einem Permanentmarker eine Markierung am superioren Anteil des Bulbus vorgenommen, um während der Präparation und der späteren mikroskopischen Untersuchung die jeweiligen Bereiche spezifisch untersuchen zu können. Um das Auge zu fixieren, wurde das periorbitale Bindegewebe mit einer chirurgischen Pinzette bulbusnah erfasst. Mit Hilfe einer gebogenen Präparierschere erfolgte die Umschneidung der Lidränder, die Befreiung des Bulbus vom umliegenden Binde- und Fettgewebe, die Durchtrennung der Augenmuskeln und der bulbären Faszien samt des Sehnervs und der Blutgefäße. Durch einen schnellen Zug wurde der Bulbus herausgezogen und bis zur Präparation der Retina in PBS (phosphatgepufferte Salzlösung, Roti®fair PBS 7.4, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) gelagert. (Abbildung 1)

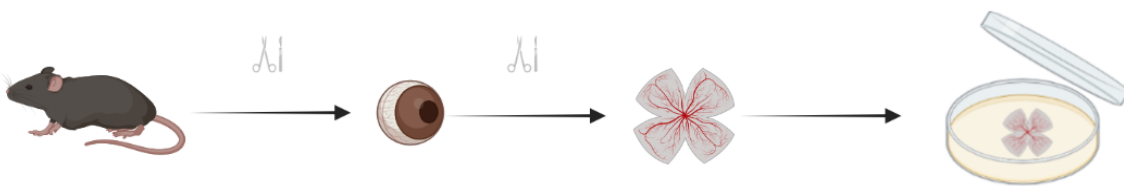


Abbildung 1

### Explantation und Flatmount-Präparation der Retina

Nach Enukleation und kurzem Waschen in PBS wurde der Bulbus unter einem Lichtmikroskop in einer Petrischale (Fisherbrand™ Petrischalen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) mit frischer PBS präpariert. Er wurde dazu am N. opticus mit einer Pinzette fixiert und ein Loch an der vorgenommenen Markierung auf Höhe der Ora serrata mit einem Skalpell geschnitten. So konnte man hinter der Ora serrata weiter schneiden, um den vorderen Teil des Bulbus inklusive Linse zu entfernen. Nach Entfernung des Glaskörpers folgte eine Markierung des superioren Anteils des Bulbus durch einen kleinen Schnitt durch die Lederhaut, Aderhaut und Retina. Die Retina wurde mit Pinzetten von der Aderhaut abgelöst und vom Rest des Bulbus entfernt. In einer Petrischale mit Kulturmedium wurde sie in Quadranten für temporal, nasal, inferior und den bereits markierten superioren Anteil kleeblattartig geschnitten, um sie flach (flatmount) auf Millipore

Filter (Millipore; Millicell; Cork, Ireland) auszubreiten. Die kleine Schnittmarkierung sollte dabei in der Mitte des superioren Quadranten liegen. Nach Beendigung des Sezierens wurde die Retina sofort in eine beschriftete Petrischale mit erwärmtem Kulturmedium überführt, um ideale Bedingungen zu schaffen. Nachdem alle Retinae eines Tages fertig präpariert waren, wurden die Präparate unter einer Mikrobiologischen Sicherheitswerkbank in die für die jeweilige Gruppe bereits vorbereiteten und vorgewärmten Zellkulturschalen mit Kulturmedium überführt. (Abbildung 1)

### Kultivierung der Retina

Die Kultivierung der Retina fand in sterilen lumox Zellkulturschalen (Ø 3,5cm, Folienboden, SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland) statt. Als Kulturmedium wurde eine selbst zusammengestellte Lösung, bestehend aus DMEM/F12 (Dulbecco's modified eagle medium, Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), 10% fetalem Kälberserum (FCS), 1% P/S (Penicillin/Streptomycin) und 15mM HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure, Gibco, Life Technologies, Kalifornien, USA) verwendet. Die Retinae wurden in ihre mit vorgewärmtem Kulturmedium gefüllten Petrischalen mit der Ganglienzellschicht nach oben in den Inkubationsschrank überführt.

### **3.2.2. Durchführung experimentelles Glaukommodell**

Für jede Gruppe wurde die gleiche Anzahl (n=6) an Retinaflachpräparaten (Flatmounts) untersucht.

Zudem wurde für jede Gruppe ein Quadrant eines Retinapräparates in Querschnitten analysiert.

### Glaukommodell 60mmHg

Um die Retina einem erhöhten hydrostatischen Druck auszusetzen, wurde eine mit manuellem Manometer ausgestattete Druckkammer verwendet, die vor Benutzung im CO<sub>2</sub>-Inkubationsschrank auf 37°C vorgewärmt und mit 95% Luftfeuchtigkeit, 5% CO<sub>2</sub> und Raumluft gefüllt wurde – ein bereits etabliertes System zur Simulation eines erhöhten hydrostatischen Drucks auf Retina und Zellen.<sup>4</sup> Es handelt sich bei der Druckkammer um eine aus Stahl selbst gefertigte Inkubationskammer. Sie besitzt einen schraubbaren Deckel, ein ungerichtetes Ventil, welches der Inkubationsluft den Eintritt in die Kammer ermöglicht, und ein abnehmbares Druckmessgerät. Nach dem Verschluss der Druckkammer konnte manuell ein Druck von 60mmHg aufgebaut und die Druckkammer im Inkubator unter



Standardbedingungen (37 °C, 5 %, 95 % relativer Luftfeuchte) positioniert werden. Die Kultivierungszeit betrug 24 Stunden.

#### Glaukommodell H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Um den oxidativen Stress zu induzieren, wurde dem Kulturmedium H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Wasserstoffperoxid 30%, SAFC®, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) mit einer Endkonzentration von 100 mM hinzugefügt. Das Kulturmedium wurde zunächst ohne H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> während des Sezierens im Inkubator vorgewärmt. Bevor die Zellkulturschalen mit Kulturmedium befüllt wurden, wurde unter der Mikrobiologischen Sicherheitswerkbank das H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dem Kulturmedium hinzugefügt und jeweils 5ml der fertigen Lösung pro Petrischale abgemessen. Der hergestellten Lösung wurde die Retina hinzugefügt und über 24 Stunden unter den o.g. Standardbedingungen inkubiert.

#### Glaukommodell Kontrolle

Für die Kontrollgruppe (n=6) wurden 5ml Kulturmedium pro Retina in eine Petrischale überführt und im Inkubator vorgewärmt. Nachdem die Retina flatmount präpariert war, wurde sie dem Kulturmedium unter der Mikrobiologischen Sicherheitswerkbank hinzugefügt und unter Standardbedingungen für 24 Stunden inkubiert.

Jede Petrischale wurde dabei mit der Tier-ID und der Abkürzung für das jeweilige Auge beschriftet.

#### Waschung und Fixierung

Nachdem die Retina aus dem Inkubator geholt und alle Präparate in eine Zellkulturplatte überführt wurden, folgte die Waschung und die Fixierung auf einem Laborschüttler. Die Waschung wurde mit PBS, das Fixieren mit 4% PFA (Paraformaldehyd, Roti®Histofix, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) vorgenommen. Nach 10 Minuten Waschung schloss sich die PFA-Fixierung über 30 Minuten an. Als vorletzter Schritt erfolgte eine weitere Waschung über 3x 10 Minuten mit PBS. In einer 30%igen Saccharose Lösung (30% Saccharose in 1xPBS) lagerte die Retina über Nacht bei 4 °C.

### 3.2.3. Färbung Retinaganzpräparate

#### Färbung mit IHC-Antikörpern

Zur Doppelfärbung wurden die primären Antikörper Mouse Anti-Brn3a (MAB 1585, Sigma-Aldrich®, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) und Rabbit Anti-RBPMS (NBP2-20112, Novus Biologicals®, Bio-Techne GmbH, Wiesbaden, Deutschland) verwendet.

Die Vorbereitung der Retina für das Färben mit primären Antikörpern bestand in einer erneuten Waschung mit PBS über 3x 10 Minuten. Es folgte eine 30-minütige Behandlung mit Blockierungslösung (bovine serum albumin (BSA) 5% (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), Triton 0,4% (Triton X-100, Sigma-Aldrich®, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) in 1X PBS). Nach Entnahme der aliquotierten Antikörper aus dem Tiefkühler, wurden diese bei Raumtemperatur aufgetaut und für 5 Sekunden bei 20 °C zentrifugiert. Die Antikörper wurden in einem Verhältnis von 1:200 für Brn3a und 1:300 für RBPMS mit Blockierungslösung (BSA 5%, Triton 0,2% in 1X PBS) verdünnt, 250µl Lösung je Retina hinzugefügt und über Nacht bei 4 °C gelagert.

Für die Vorbereitung der anderen Präparate für die Neurofilament-H-Färbung wurde das Schema wie oben genannt befolgt. Jedoch wurde hier mit primären Antikörpern für Rabbit Anti-Neurofilament-H (AB1989, Sigma-Aldrich®, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) gearbeitet. Sie wurden nach den Waschungen und der 30-minütigen Behandlung mit Blockierungslösung (BSA 5%, Triton 0,4% in 1x PBS) in einem Verhältnis von 1:200 mit Blockierungslösung (BSA 5%, Triton 0,2% in 1X PBS) gemischt und 250µl je Retina hinzugefügt.

Am nächsten Tag erfolgte die Färbung mit den sekundären Antikörpern. Dazu wurden Alexa Fluor 488 Goat Anti-Mouse IgG (ab 150113, abcam®, Cambridge, Vereinigtes Königreich) und Alexa Fluor 647 Monkey Anti-Rabbit IgG (ab 150075, abcam®, Cambridge, Vereinigtes Königreich) verwendet. Die vorhandene Lösung der primären Antikörper wurde heraus pipettiert und PBS-T (phosphatgepufferte Kochsalzlösung mit 0,3% Triton) zur erneuten Waschung für 3x 5-10 Minuten hinzugefügt. Die sekundären Antikörper wurden im Verhältnis 1:1000 mit Blockierungslösung (BSA 5%, Triton 0,2% in 1X PBS) verdünnt und die Retina damit für eine Stunde behandelt. Wichtig war hier, die angefertigte Lösung und die damit behandelte Retina aufgrund der beinhaltenden Fluoreszenz vor Licht zu schützen. Dazu wurde das Gefäß mit Aluminiumfolie abgedeckt.

Nachdem die Färbung vollzogen war, wurde die Retina 3x 5-10 Minuten mit PBS-T gewaschen und auf einem Objektträger unter dem Lichtmikroskop montiert.

Es ist zu beachten, dass nicht alle Retinae in derselben Charge präpariert und gefärbt wurden und dass eine gewisse technische Variabilität zu berücksichtigen ist.

### Das Montieren auf Objektträger

Nachdem die Färbung vollendet war, wurde das Präparat auf einen Objektträger (Epredia™ SuperFrost Plus™ Adhäsionsobjektträger, 75x25mm, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) überführt. Zu diesem Zweck wurde vorher ein Tropfen PBS auf den Objektträger gegeben. Das PBS wurde, nachdem die Retina positioniert war, mit einem feinen sauberen Papiertuch abgesogen. Der selbe Vorgang ereignete sich dann mit Millipore bidestilliertem Wasser (MicroPure Barnstead, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Das endgültige Montieren fand mit Hilfe von Fluorescence Mounting Medium (Dako, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) und dem Aufbringen eines für Fluoreszenzmikroskopie geeigneten Deckglases (Menzel™ Microscope Coverslips, 50x24mm, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) statt. Hier musste ebenso auf einen geringen Lichteinfluss geachtet und zügig gearbeitet werden.

Nach dem Montieren trockneten die Objektträger bei 4 °C über Nacht in einer Objektträgermappe aus Pappe aus. (Abbildung 2)

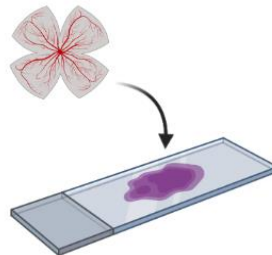


Abbildung 2

### **3.2.4. Herstellung und Färbung Querschnitte**

#### Herstellung Querschnitte

Nachdem die Retinae bei 4 °C über Nacht in 30%iger Saccharose Lösung aufbewahrt wurden, wurden Kryoeinbettformen mit Einbettmedium (Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound, Sakura Finetek Germany GmbH, Staufem im Breisgau, Deutschland) gefüllt und die Retinaquadranten jeweils inkl. Filterpapier darin eingebettet und auf Trockeneis eingefroren. Durch eine Medizinisch-technische Assistentin erfolgte die Herstellung der Querschnitte (10µm) im Kryostat und das Montieren auf die o.g. Objektträger. Bis zur Färbung mit IHC-Antikörpern wurden die Querschnitte bei -80 °C gelagert.

### Färbung Querschnitte

Die Querschnitte wurden jeweils entweder mit den Antikörpern Mouse Anti-Brn3a (MAB 1585, Sigma-Aldrich®, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland), Rabbit Anti-RBPMS (NBP2-20112, Novus Biologicals®, Bio-Techne GmbH, Wiesbaden, Deutschland) oder Rabbit Anti-Neurofilament-H (AB1989, Sigma-Aldrich®, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) gefärbt. Zunächst wurden die Querschnitte bei Raumtemperatur aufgetaut. Anschließend folgte eine 3x 5-minütige Waschung mit PBS. Die Präparate wurden für 30 Minuten mit Blockierungslösung (BSA 5%, Triton 0,2% in 1X PBS) behandelt. In einer Verdünnung von 1:200 für Brn3a, 1:300 für RBPMS und 1:200 für Neurofilament-H mit Blockierungslösung (BSA 5%, Triton 0,2% in 1X PBS) wurden die Querschnitte nun 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei musste darauf geachtet werden, dass die Lösung nicht verdunstet. Es folgte eine 3-malige Waschung mit PBS für jeweils 5 Minuten. Die Sekundärantikörper wurden im Verhältnis 1:1000 mit Blockierungslösung (BSA 5%, Triton 0,2% in 1X PBS) verdünnt und die Querschnitte für eine Stunde im Dunkeln behandelt. Bevor die Präparate mit VECTASHIELD® Antifade Mounting Medium mit DAPI (BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching, Deutschland) und einem Deckglas bedeckt wurden, erfolgte eine letzte Waschung mit PBS für 3x 5 Minuten.

### **3.2.5. Mikroskopie**

In diesem Projekt wurden pro Quadrant neun Bilder mit einem Zeiss Axio Imager 2 Mikroskop mit Apotome-Fluoreszenzbeleuchtung (Carl Zeiss; Jena, Deutschland) und der Zen pro-Software (Carl Zeiss, Jena, Deutschland) aufgenommen.

Das Mikroskop war für unsere fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen der Arbeitsgemeinschaft (AG) Prokosch-Willing voreingestellt. Es wurde jedoch immer zu Beginn unter der Rubrik Acquisition auf Fluoreszenz eingestellt und die Kanäle entsprechend der Wellenlänge des mit dem Fluoreszenzfarbstoff markierten sekundären Antikörper ausgewählt. Der Kanal für Brn3a war EGFP, der Kanal für RBPMS und Neurofilament-H war ePlum. Die Lichtquelle war HXP.

Zunächst wurde das Präparat mit der kleinsten Vergrößerung vollkommen betrachtet und auf den Bereich des Ausgangs des N. opticus gezielt. Mit einer stärkeren Vergrößerung wurde schließlich der jeweilig zu untersuchende Quadrant inspiziert.

Dabei musste darauf geachtet werden, aus welchem Quadranten die Bilder aufgenommen werden. Die Bilder sollten jeweils von peripher nach zentral gemacht werden.

Nach dem Auswählen eines geeigneten Areals mit 40-facher Vergrößerung (40x Objektiv) im jeweiligen Quadranten wurde nach scharf stellen des jeweiligen Kanals Set Exposure ausgewählt, um die Belichtung zu optimieren. Durch Set Last und Set First im Z-Stack wurde

die erste und letzte Schicht festgelegt, aus denen das Bild entstehen sollte. Dabei musste darauf geachtet werden, dass insgesamt maximal 2 Z-Abschnitte zur Berechnung eines Bildes dienen sollten. Durch Start Experiment wurde das Bild durch das Mikroskop berechnet. Anschließend folgte die Bearbeitung des Bildes durch die Optionen Ortho, MIP (Maximum Intensity Projection), XY-Plane, Create und Best fit. Dadurch konnten die Leuchtkraft der RGCs und Axone und die Hintergrundbeleuchtung optimiert werden. Anschließend konnte unter der Rubrik Graphics der Maßstab (20µm) eingefügt werden. Zunächst erfolgte das Speichern des Zeiss-Bildes, anschließend der Export als JPEG. Es wurden jeweils von peripher, medial und zentral drei Bilder, also 36 Bilder je Präparat, erfasst. Insgesamt wurden somit 648 Bilder zur statistischen Auswertung aufgenommen. Die Mikroskopeinstellung zur Erstellung der Bilder der Querschnitte war gleich der der Flatmounts. Hier wurden ebenfalls mit der geringsten Vergrößerung die zu untersuchenden Präparatschnitte gesucht und mit der 20-fachen Vergrößerung (50µm Maßstab) nach Scharfstellung die Bilder angefertigt.

### **3.2.6. Zellauszählung und Messung Fluoreszenzintensität**

Zur Zählung der RGCs wurde die Software ImageJ (<https://imagej.net/downloads;> 06.10.2021) verwendet. Das zu untersuchende Bild wurde zunächst in das Programm importiert. Die RGCs wurden im Bild des jeweiligen Kanals gezählt, da es bei der Auszählung im Bild der Doppelfärbung durch Überlagerungen oft zu nicht übereinstimmenden Zählungen kam. Dazu wurden die RGCs manuell unter der Einstellung ‚Point‘ mit einem Klick markiert, wodurch das Programm die Markierungen zählte.

Die Fluoreszenzintensität (integrated density/IntDen) der Präparate wurde unter Berücksichtigung der als einheitlich angesehenen Hintergrundintensität nach einem von uns erstellten Protokoll berechnet:

Zuerst wurde das Bild in das Programm ImageJ importiert und der Maßstab angepasst, um die Größe der gemessenen Fläche zu normalisieren.

Die durchschnittliche Hintergrund-Fluoreszenzintensität wurde anschließend in drei Bereichen mit dem Rechteckwerkzeug gemessen, der Mittelwert davon als Variable B benutzt.

Die zu untersuchende Fläche der Retina wurde nun mit dem Rechteckwerkzeug gemessen und als Variable F verwendet.

Normalisierung der Fluoreszenzdaten:

1. Die Fluoreszenzintensität des Hintergrundes wurde von Experiment zu Experiment als gleichbleibend angesehen. Daher wurde die Intensität der Hintergrund-Fluoreszenzsignale zur Normalisierung der Fluoreszenzsignale für den Vergleich der Bilder aus mehreren Experimenten zu verschiedenen Zeitpunkten verwendet, so wie Housekeeping-Gene und Proteine zur Normalisierung der Ergebnisse von PCR-Gelen bzw. Western Blots verwendet werden.

2. Um das Fluoreszenzsignal zu normalisieren, wurde ein Bild aus einem Experiment als Referenz definiert, auf die die anderen Bilder aus anderen Experimenten normalisiert wurden. Diese Wahl konnte willkürlich sein.

Die normalisierten Werte lauteten wie folgt:  $F(Ny) = F(y) * B1/B(y)$

$B1$  = mittlere Hintergrundfluoreszenz auf dem Referenzbild

$B(y)$  = mittlere Hintergrundfluoreszenz auf dem gemessenen Bild "y"

$F(y)$  = mittlere Fluoreszenzintensität für die Retinafläche "F" auf dem Bild "y"

$F(Ny)$  = normalisierte Fluoreszenzintensität für die Retinafläche "F" auf dem Bild "y".

3. Nach der Normalisierung auf die Hintergrundfluoreszenz konnten die relativen Expressionswerte zwischen den Gruppen verglichen werden. Durch den Vergleich dieser Fluoreszenzintensitäten ließen sich relative Unterschiede zwischen den Testgruppen feststellen.

### **3.2.7. Statistik**

Aus den Werten aller Bilder der jeweiligen Untersuchungsgruppe wurden für unterschiedliche Bereiche der Präparate Mittelwerte berechnet. Dabei wurde nach den jeweiligen Quadranten (temporal, superior, nasal, inferior) und nach Zentral-Mitte-Peripher selektiert. Mit diesen Mittelwerten wurden die Untersuchungsgruppen in jeglicher Kombination verglichen.

Als Signifikanztest diente die einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA). Dazu wurden die jeweiligen Mittelwerte der 3 Untersuchungsgruppen in allen möglichen Dreier-Kombinationen mit der ANOVA gegeneinander getestet, um herauszufinden zwischen welchen Gruppenvariablen ein signifikanter Unterschied bestand. Ein p-Wert von  $\leq 0,05$  wurde als signifikantes Ergebnis angesehen ( $p \leq 0,05=*$ ,  $p \leq 0,01=**$ ,  $p \leq 0,001=***$ ). Nicht signifikante Ergebnisse wurden in der graphischen Darstellung ebenfalls angegeben (ns).

Die Mittelwerte der Untersuchungsgruppen wurden jeweils mit der jeweiligen Standardabweichung (SD) graphisch dargestellt.

Die statistische Auswertung bediente sich der Statistiksoftware SPSS Statistics® (Version 28.0.1.1, IBM®, Armonk, NY, USA). Die graphische Darstellung erfolgte mit der Statistiksoftware GraphPad Prism (Version 9.0.0, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) mittels Säulendiagramm sowie mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Excel (Version 16.74, Microsoft®, Redmond, Washington, USA) mittels Tortendiagramm. Die Tabellenerstellung bediente sich ebenfalls dem Tabellenkalkulationsprogramm Excel.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Flatmounts

#### 4.1.1. Kontroll-Präparate

Innerhalb der Kontrollpräparate wurde deutlich, dass die mit RBPMS markierten RGCs den mit Brn3a markierten RGCs zahlenmäßig überlegen waren. Mit +61,2% war dies im temporalen Quadranten am ausgeprägtesten (superior +30,1%, nasal +32,6%, inferior +39,3%). Die Anzahl der RGCs beider Färbungen war im nasalen Quadranten am höchsten. (Abbildung 3)

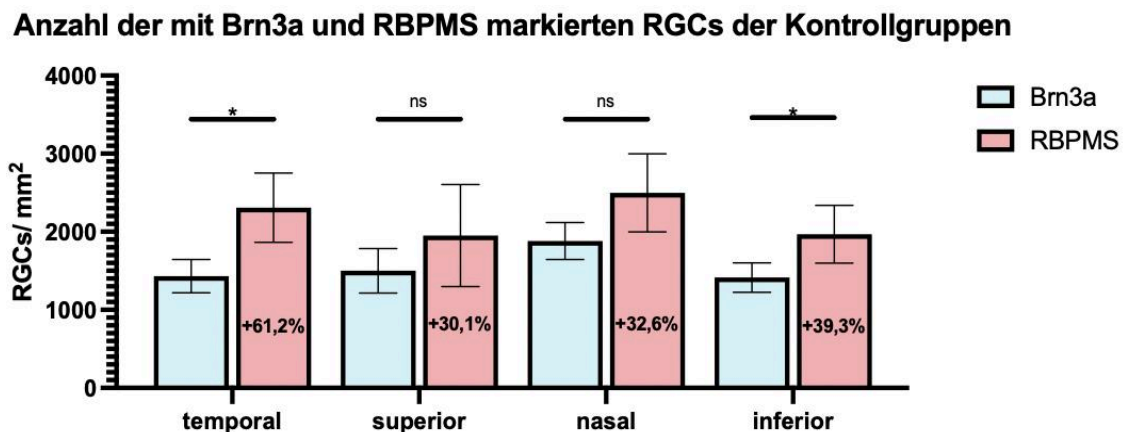


Abbildung 3

#### 4.1.2. Ergebnisse der 60mmHg-Präparate temporal, superior, nasal und inferior

##### 60mmHg-Präparate

Ein Zusammenhang zwischen erhöhtem Druck (60mmHg) und einem Verlust der RGCs ergab sich in der Brn3a- sowie in der RBPMS-Färbung.

(Abbildung 5+Abbildung 9)

##### 60mmHg-Brn3a

Die 60mmHg-Präparate der Brn3a-Färbung waren in allen Bereichen mit einem Verlust assoziiert. Der Rückgang stellte eine signifikante ( $p \leq 0,01$ ) Differenz zur Kontrollgruppe dar.



Diese Signifikanz konnte für die 60mmHg-Präparate der RBPMS-Färbung nicht bestätigt werden (Abbildung 8). In allen Quadranten der Brn3a-Färbung gab es einen Verlust von > 60% (temporal 62,11%, superior 63,06%, nasal 61,92%, inferior 63,68%). Die totale Anzahl sank auf < 721 RGCs/mm<sup>2</sup> (temporal 616,00 +/- SD RGCs/mm<sup>2</sup>, superior 555,27 +/- SD RGCs/mm<sup>2</sup>, nasal 720,80 +/-SD RGCs/mm<sup>2</sup>, inferior 511,72 +/-SD RGCs/mm<sup>2</sup>).

(Abbildung 4+Abbildung 5+Abbildung 6+Tabelle 1)

#### 60mmHg-RBPMS

Einen Verlust von ca. 40% verzeichneten die 60mmHg-Präparate der RBPMS-Färbung im temporalen und inferioren Quadranten (temporal 41,48%, superior 15,00%, nasal 21,78%, inferior 39,17%). Mit einer Anzahl von 1353,46 RGCs/mm<sup>2</sup> war der temporale Quadrant der anfälligste Quadrant gegenüber der 60mmHg-Behandlung (superior 1752,56 RGCs/mm<sup>2</sup>, nasal 2064,87 RGCs/mm<sup>2</sup>, inferior 1769,91 RGCs/mm<sup>2</sup>). Der superiore Quadrant war am geringsten anfällig gegenüber der 60mmHg-Behandlung.

(Abbildung 8+Abbildung 9+Abbildung 10+Tabelle 2)

#### 60mmHg-Neurofilament-H

Den stärksten Zusammenhang zwischen 60mmHg und Verlust zeigten temporal und inferior mit einem Verlust der RGCs von > 70% (temporal 75,23%, inferior 70,59%). Dabei wies inferior einen statistisch signifikanten Rückgang der RGC-Zahl ( $p \leq 0,001$ ) gegenüber 60mmHg im Vergleich zur Kontrolle auf. Der nasale Quadrant war am geringsten anfällig gegenüber 60mmHg (25,05%).

(Abbildung 12+Abbildung 13+Abbildung 14+Tabelle 3)

### **4.1.3. Ergebnisse der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Präparate temporal, superior, nasal und inferior**

#### H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Präparate

Der Verlust der mit RBPMS markierten RGCs war generalisierter ausgeprägt (Abbildung 9+Abbildung 11) als der Verlust der mit Brn3a markierten RGCs in den H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Präparaten (Abbildung 5+Abbildung 7).

#### H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Brn3a

Der nasale Quadrant war mit einem Verlust von 41,53% ( $p \leq 0,05$ ) am anfälligsten, während der inferiore Quadrant den geringsten Verlust an RGCs aufwies (temporal 9,40%, superior 11,92%, inferior 0,80%). Nasal lagen im Mittel 1110,53 +/- SD RGCs/mm<sup>2</sup>.

(Abbildung 4+Abbildung 5+Abbildung 7 +Tabelle 1)

### H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-RBPMS

In den H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Präparaten der RBPMS-Färbung zeigte der nasale Quadrant mit 35,95% den größten Verlust. Den geringsten Verlust wies der inferiore Quadrant mit 13,00% auf (temporal 27,67%, superior 23,13%). Im nasalen Quadranten bestand ein signifikanter ( $p \leq 0,05$ ) Rückgang der RGCs auf 1596,39 RGCs/mm<sup>2</sup>. Die höchste Anzahl an RGCs zeigte sich superior (1891,38 RGCs/mm<sup>2</sup>) und inferior 1848,00 RGCs/mm<sup>2</sup>).

(Abbildung 8+Abbildung 9+Abbildung 11+Tabelle 2)

### H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Neurofilament-H

Den höchsten Verlust verzeichnete der temporale Quadrant mit 65,65% gefolgt vom Nasalen 61,52%, Inferioren 42,62% und Superioren 41,13%. Der Rückgang war zum Teil signifikant (superior  $p \leq 0,001$ , nasal  $p \leq 0,05$ ).

(Abbildung 12+Abbildung 13+Abbildung 15+Tabelle 3)

### 60mmHg-/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Brn3a

Alle Quadranten waren anfälliger gegenüber 60mmHg als gegenüber H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Dabei waren temporal, superior und inferior im Vergleich signifikant ( $p \leq 0,01$ ) stärker von einem Rückgang der RGCs betroffen, nasal jedoch nicht.

(Abbildung 4+Abbildung 5+Tabelle 1)

### 60mmHg-/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-RBPMS

Sowohl der nasale als auch der superiore Quadrant waren anfälliger gegenüber H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als gegenüber 60mmHg. Inferior und temporal zeigten eine geringere Anfälligkeit gegenüber H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als gegenüber 60mmHg.

(Abbildung 8+Abbildung 9+Tabelle 2)

### 60mmHg-/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Neurofilament-H

Der temporale Quadrant war nahezu gleich hoch von einem Verlust betroffen gegenüber H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wie auch 60mmHg. Etwas stärker jedoch gegenüber 60mmHg. Inferior war anfälliger gegenüber 60mmHg, während superior und nasal einen erhöhten Rückgang gegenüber H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aufwiesen.

(Abbildung 12+Abbildung 13+Tabelle 3)

	Verlust (%) 60mmHg	Verlust (%) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	RGCs/mm <sup>2</sup> 60mmHg	RGCs/mm <sup>2</sup> H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Signifikanz 60mmHg zur Kontrollgruppe	Signifikanz H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> zur Kontrollgruppe	Signifikanz 60mmHg zu H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Temporal	62,11	9,40	616,00	1344,79	p ≤ 0,01	–	p ≤ 0,01
Superior	63,06	11,92	555,27	1498,68	p ≤ 0,01	–	p ≤ 0,01
Nasal	61,92	41,53	720,80	1110,53	p ≤ 0,01	p ≤ 0,05	–
Inferior	63,68	0,80	511,72	1403,01	p ≤ 0,01	–	p ≤ 0,01

Tabelle 1: Die Tabelle beschreibt den Verlust (%), die Anzahl der RGCs/mm<sup>2</sup> sowie die Signifikanz in den Quadranten der mit Brn3a markierten Präparate. Dabei wird ersichtlich, dass durch die 60mmHg Behandlung alle Quadranten signifikant (p ≤ 0,01) betroffen waren und einen Verlust von > 60% aufwiesen. Bei den H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Präparaten war der nasale Quadrant am anfälligsten (p ≤ 0,05). Die Präparate waren anfälliger gegenüber 60mmHg als gegenüber H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

(Abbildung 28)

#### Anzahl der mit Brn3a markierten RGCs temporal, superior, nasal und inferior

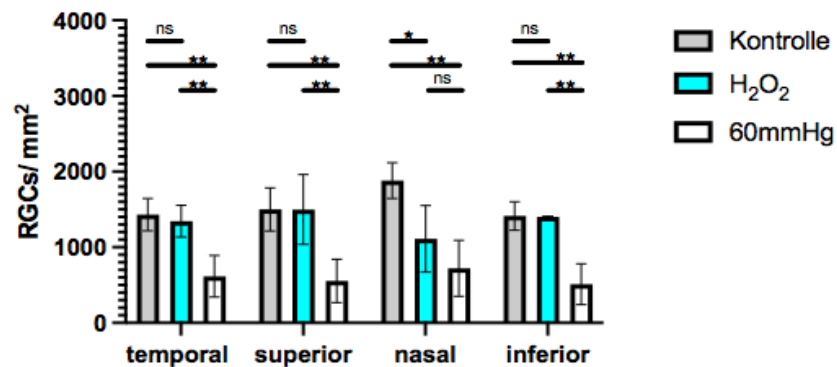


Abbildung 4

**Verlust der mit Brn3a markierten RGCs temporal, superior, nasal und inferior**

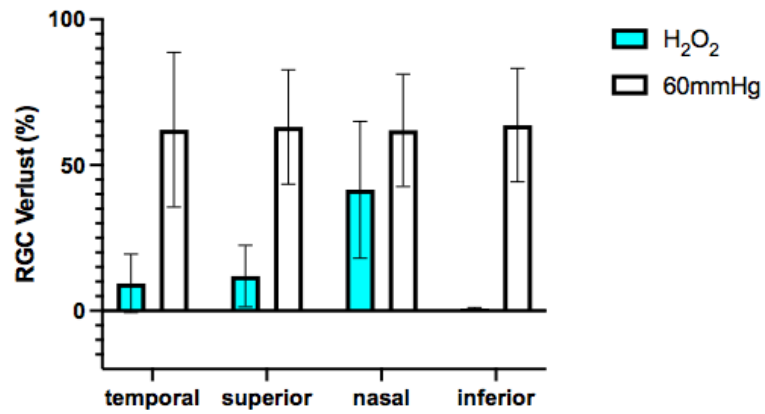


Abbildung 5

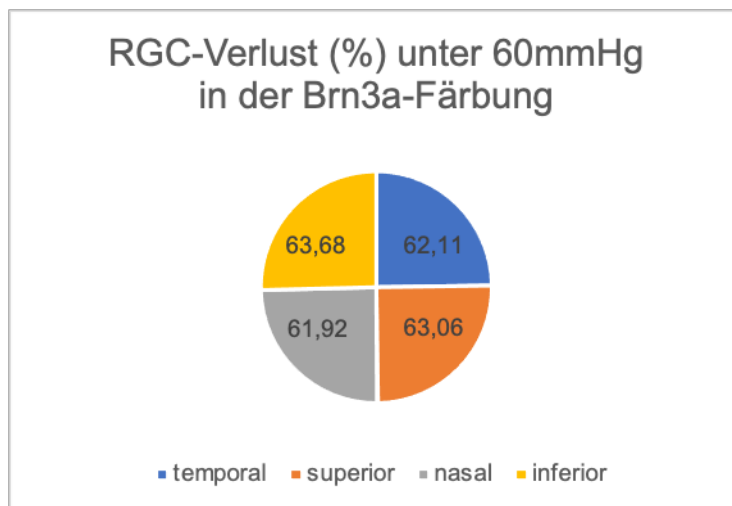


Abbildung 6

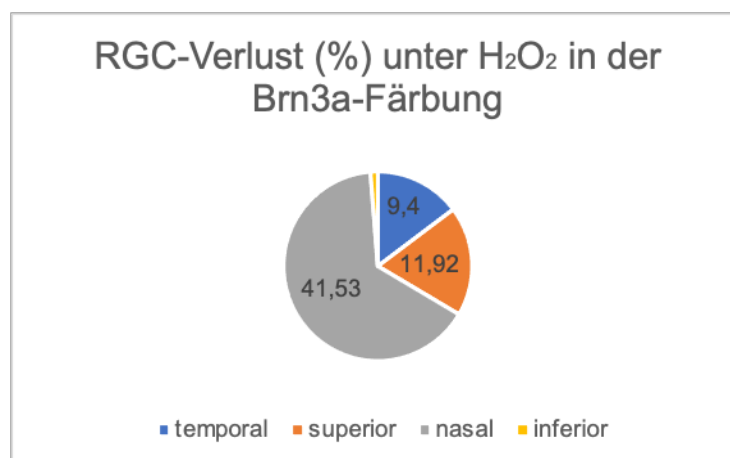


Abbildung 7

	Verlust (%) 60mmHg	Verlust (%) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Anzahl/mm <sup>2</sup> 60mmHg	Anzahl/mm <sup>2</sup> H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Signifikanz 60mmHg zur Kontrollgruppe	Signifikanz H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> zur Kontrollgruppe	Signifikanz 60mmHg zu H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Temporal	41,48	27,67	1353,46	1743,89	–	–	–
Superior	15,00	23,13	1752,56	1891,38	–	–	–
Nasal	21,78	35,95	2064,87	1596,39	–	p ≤ 0,05	–
Inferior	39,17	13,00	1769,91	1848,00	–	–	–

Tabelle 2: Die Tabelle beschreibt den Verlust (%), die Anzahl der RGCs/mm<sup>2</sup> sowie die Signifikanz der mit RBPMs markierten Präparate. Hierbei wird ersichtlich, dass temporal in den 60mmHg-Präparaten den höchsten Verlust aufwies, während nasal in den H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Präparaten einen signifikanten (p ≤ 0,05) Verlust zeigte.

(Abbildung 28)

### Anzahl der mit RBPMs markierten RGCs temporal, superior, nasal und inferior

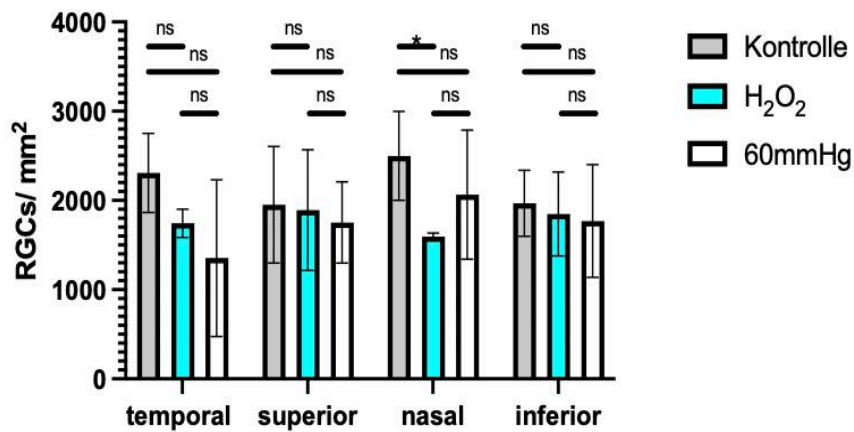


Abbildung 8

Verlust der mit RBPMS markierten RGCs temporal, superior, nasal und inferior

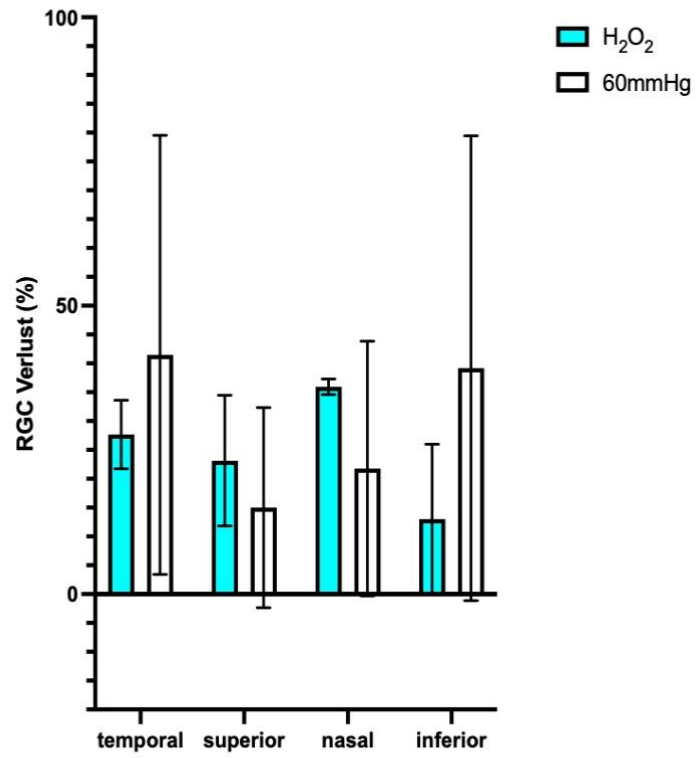


Abbildung 9

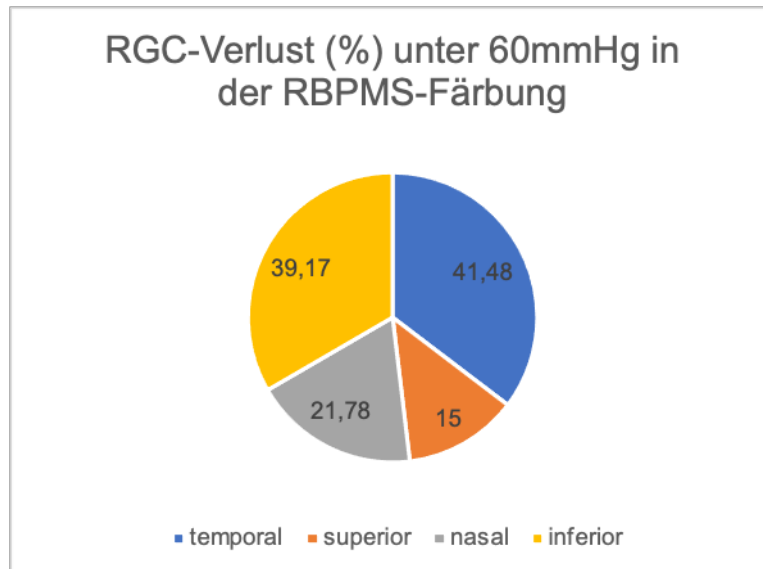


Abbildung 10

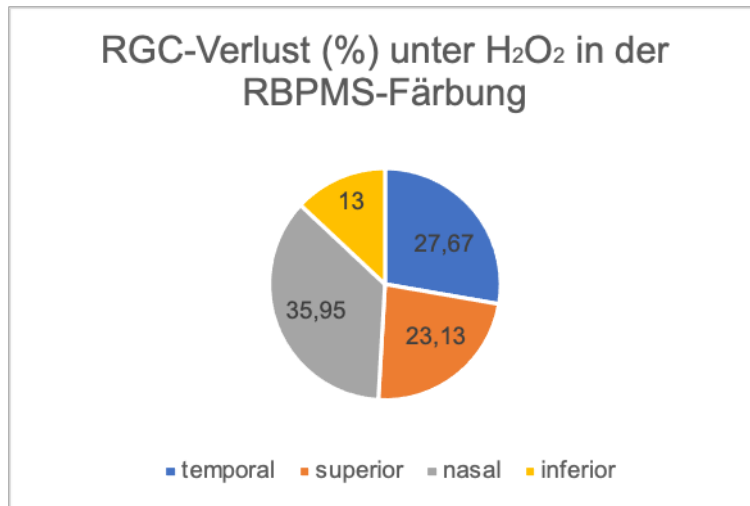


Abbildung 11

	Verlust (%) 60mmHg	Verlust (%) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Fluoreszenz- stärke (IntDen) 60mmHg	Fluoreszenz- stärke (IntDen) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Signifikanz 60mmHg zur Kontrollgruppe	Signifikanz H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> zur Kontrollgruppe	Signifikanz 60mmHg zu H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Temporal	75,23	65,65	93432,2	75898,0	—	—	—
Superior	38,78	41,13	69503,7	62025,0	—	p ≤ 0,001	—
Nasal	25,05	61,52	114463,0	45514,5	—	p ≤ 0,05	—
Inferior	70,59	42,62	32856,2	64089,9	p ≤ 0,001	—	—

Tabelle 3: Die Tabelle beschreibt den Verlust (%), die Stärke der Fluoreszenz/mm<sup>2</sup> (IntDen) sowie die Signifikanz der mit Neurofilament-H markierten Präparate. Hierbei wird ersichtlich, dass temporal und inferior am anfälligsten gegenüber 60mmHg waren. Ebenfalls waren sie anfälliger gegenüber 60mmHg als gegenüber H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

**Stärke der Fluoreszenz der mit Neurofilament-H markierten Axone temporal, superior, nasal und inferior**

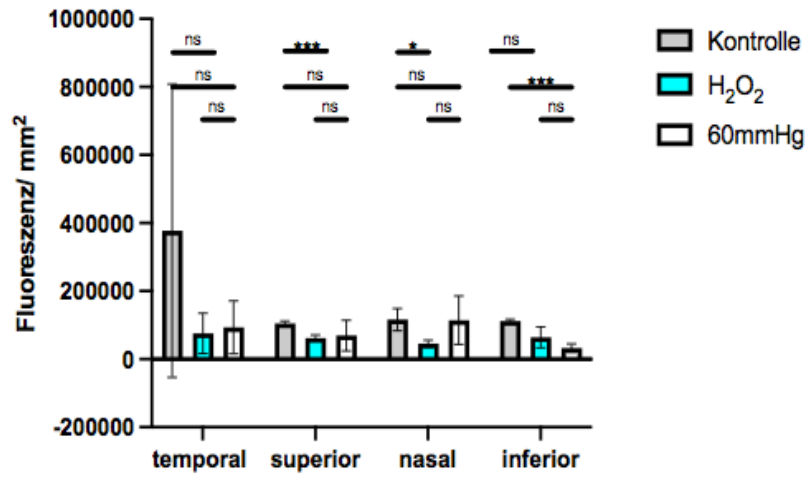


Abbildung 12

**Verlust der Fluoreszenz der mit Neurofilament-H markierten Axone temporal, superior, nasal und inferior**

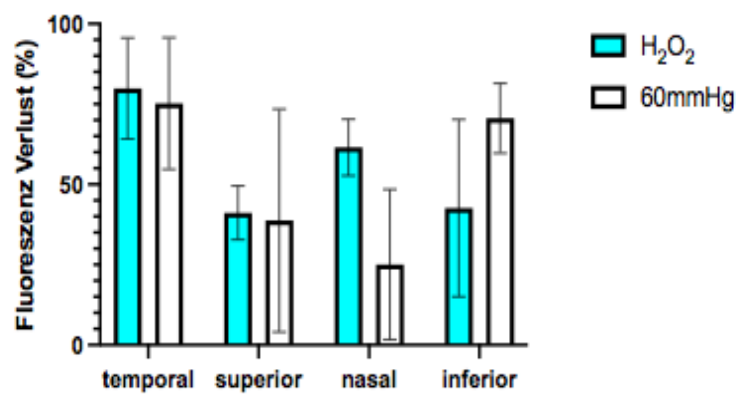


Abbildung 13



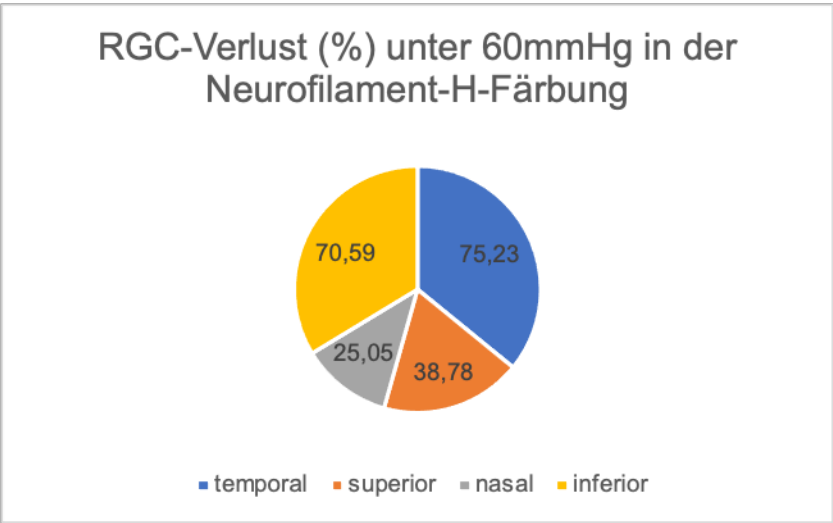


Abbildung 14

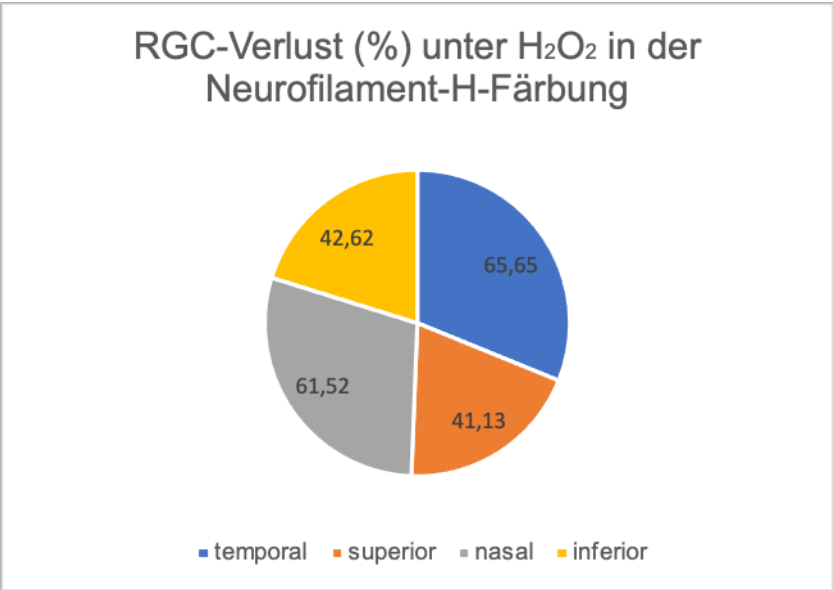


Abbildung 15

#### **4.1.4. Ergebnisse der 60mmHg-Präparate zentral, mittig und peripher**

##### 60mmHg-Brn3a

Die Auswertung der RGC-Anzahl auf die Bereiche Zentral, Mitte und Peripher zeigte einen signifikanten Rückgang der Anzahl in allen Bereichen auf  $< 703$  RGCs/mm<sup>2</sup> im Vergleich zur Kontrollgruppe (Zentral 702,76 RGCs/mm<sup>2</sup> +-SD ( $p \leq 0,001$ ), Mitte 581,30 RGCs/mm<sup>2</sup> +- SD ( $p \leq 0,01$ ), Peripher 442,48 RGCs/mm<sup>2</sup> +-SD ( $p \leq 0,01$ ). Dies entspricht einem jeweiligen Verlust von  $> 65\%$ , wobei die Mitte und Zentral in einem etwas höheren Maße betroffen waren (Zentral 67,03%, Mitte 68,87%, Peripher 65,67%).

(Abbildung 16+Abbildung 17+Abbildung 18+Tabelle 4)

##### 60mmHg-RBPMS

In den 60mmHg-Präparaten der RBPMS-Färbung ist ein kontinuierlicher Rückgang von Zentral (2299,15 RGCs/mm<sup>2</sup>) nach Peripher (1457,57 RGCs/mm<sup>2</sup>) zu beobachten. Die peripheren Bereiche waren anfälliger gegenüber 60mmHg als die zentralen und mittleren Bereiche (Zentral 17,00%, Mitte 16,87%, Peripher 18,84%,).

(Abbildung 20+Abbildung 21+Abbildung 22+Tabelle 5)

##### 60mmHg-Neurofilament-H

Die Stärke der Fluoreszenz (IntDen) sank vom zentralen (150121,0) über den mittleren Bereich (65981,3) nach Peripher (29567,9) hin ab. Peripher wies eine signifikante ( $p \leq 0,01$ ) Reduktion der Fluoreszenz auf im Vergleich zur Kontrolle. Peripher war mit 62,67% Verlust am stärksten betroffen, gefolgt vom zentralen Bereich (57,43%) und der Mitte (35,67%).

(Abbildung 24+Abbildung 25+Abbildung 26+Tabelle 6)

#### **4.1.5. Ergebnisse der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Präparate zentral, mittig und peripher**

##### H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Brn3a

Die zentralen und mittleren Bereiche der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Präparate wiesen im Vergleich zur Kontrollgruppe im Gegensatz zur Peripherie einen signifikanten ( $p \leq 0,05$ ) Rückgang der RGC-Anzahl auf (Zentral 1518,32 RGCs/mm<sup>2</sup> +- SD, Mitte 1353,46 RGCs/mm<sup>2</sup> +- SD, Peripher 1292,73 RGCs/mm<sup>2</sup> +-SD). Mit  $> 29\%$  Verlust waren die zentralen und mittleren Bereiche anfälliger als die peripher gelegenen Bereiche (Peripher 8,17%).

(Abbildung 16+Abbildung 17+ Abbildung 19+Tabelle 4)

### H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-RBPMS

Die RGC-Anzahl sank von den zentralen zu den peripher gelegenen Arealen. Dabei waren die zentral und mittig gelegenen Areale mit > 22% anfälliger gegenüber H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als die peripher gelegenen Areale. (Zentral 22,67%, Mitte 23,07%, Peripher 9,39%).

(Abbildung 20+Abbildung 21+Abbildung 23+Tabelle 5)

### H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Neurofilament-H

Zentral war mit einem Verlust von 82,58% anfälliger gegenüber H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als die Mitte (31,33%) und Peripher (29,72%).

(Abbildung 24+Abbildung 25+Abbildung 27+Tabelle 6)

### 60mmHg-/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Brn3a

Die RGCs waren signifikant anfälliger ( $p \leq 0,05$ ) gegenüber 60mmHg als H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in allen Bereichen.

(Abbildung 16+Abbildung 17+Tabelle 4)

### 60mmHg-/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-RBPMS

Der zentrale Bereich und die Mitte waren anfälliger gegenüber H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als 60mmHg. In den peripher gelegenen Bereichen waren die RGCs anfälliger gegenüber 60mmHg.

(Abbildung 20+Abbildung 21+Tabelle 5)

### 60mmHg-/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Neurofilament-H

Zentral zeigte einen stärkeren Verlust gegenüber H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, die Mitte und Peripher jedoch auf 60mmHg. Die Mitte zeigte dabei eine nahezu gleich hohe Anfälligkeit.

(Abbildung 24+Abbildung 25+Tabelle 6)

	Verlust (%) 60mmHg	Verlust (%) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	RGCs/mm <sup>2</sup> 60mmHg	Anzahl/mm <sup>2</sup> H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Signifikanz 60mmHg zur Kontrollgruppe	Signifikanz H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> zur Kontrollgruppe	Signifikanz 60mmHg zu H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Zentral	67,03	29,13	702,76	1518,32	p ≤ 0,001	p ≤ 0,05	p ≤ 0,05
Mitte	68,87	29,24	581,30	1353,46	p ≤ 0,01	p ≤ 0,05	p ≤ 0,05
Peripher	65,67	8,17	442,48	1292,73	p ≤ 0,01	—	p ≤ 0,05

Tabelle 4: Die Tabelle beschreibt den Verlust (%), die Anzahl der RGCs/mm<sup>2</sup> sowie die Signifikanz der mit Brn3a markierten Präparate. Hierbei wird ersichtlich, dass die 60mmHg-Präparate signifikant stärker von einem Verlust betroffen waren als die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Präparate.

**Anzahl der mit Brn3a markierten RGCs zentral, mittig und peripher**

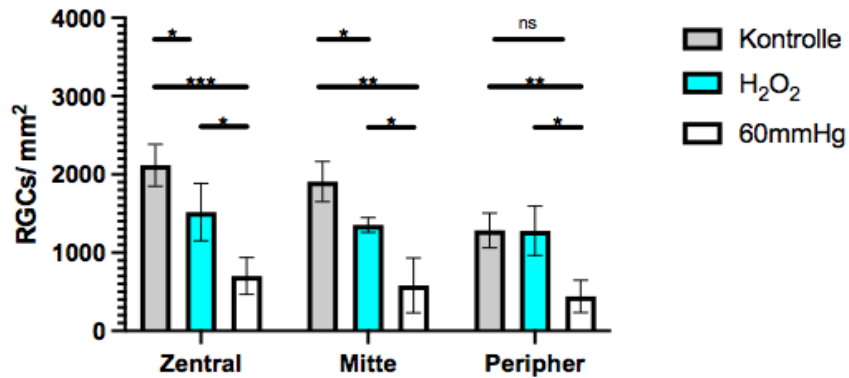


Abbildung 16

**Verlust der mit Brn3a markierten RGCs zentral, mittig und peripher**

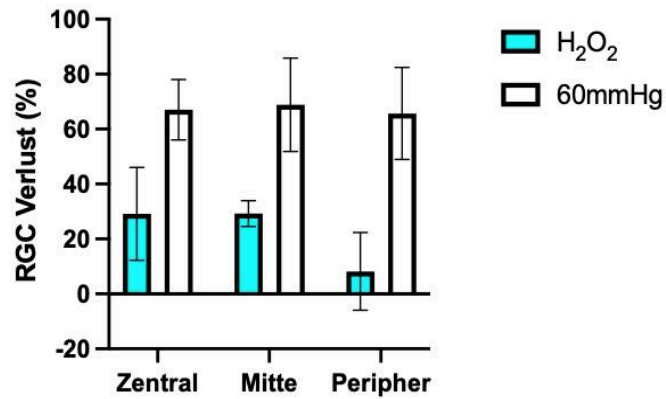


Abbildung 17

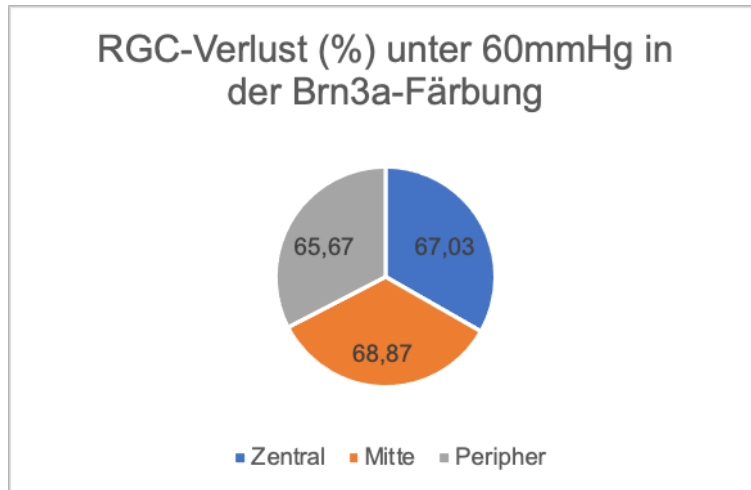


Abbildung 18

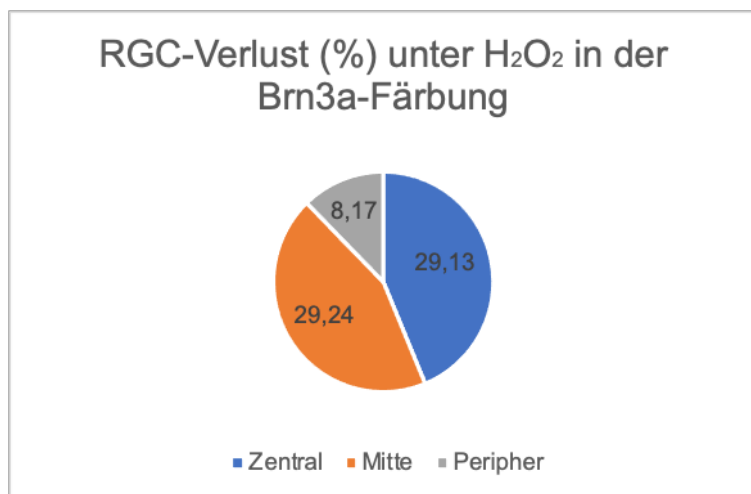


Abbildung 19

	Verlust (%) 60mmHg	Verlust (%) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	RGCs/mm <sup>2</sup> 60mmHg	RGCs/mm <sup>2</sup> H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Signifikanz 60mmHg zur Kontrollgruppe	Signifikanz H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> zur Kontrollgruppe	Signifikanz 60mmHg zu H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Zentral	17,00	22,67	2299,15	2012,84	-	-	-
Mitte	16,87	23,07	1917,4	1795,94	-	-	-
Peripher	18,84	9,39	1457,57	1500,95	-	-	-

Tabelle 5: Die Tabelle beschreibt den Verlust (%), die Anzahl der RGCs/mm<sup>2</sup> sowie die Signifikanz der mit RBPMS markierten Präparate. Die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Präparate wiesen zentral und mittig einen höheren Verlust auf als die 60mmHg-Präparate.

**Anzahl der mit RBPMS markierten RGCs zentral, mittig und peripher**

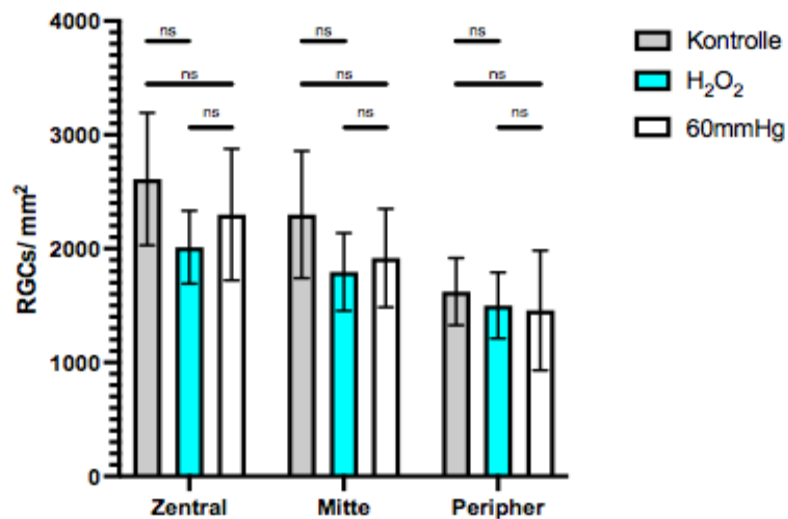


Abbildung 20

**Verlust der mit RBPMS markierten RGCs zentral, mittig und peripher**

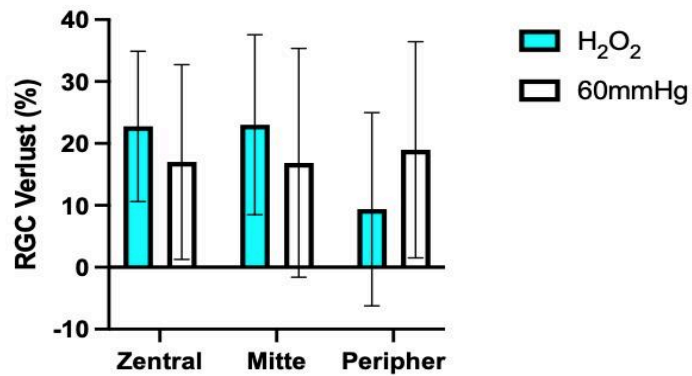


Abbildung 21

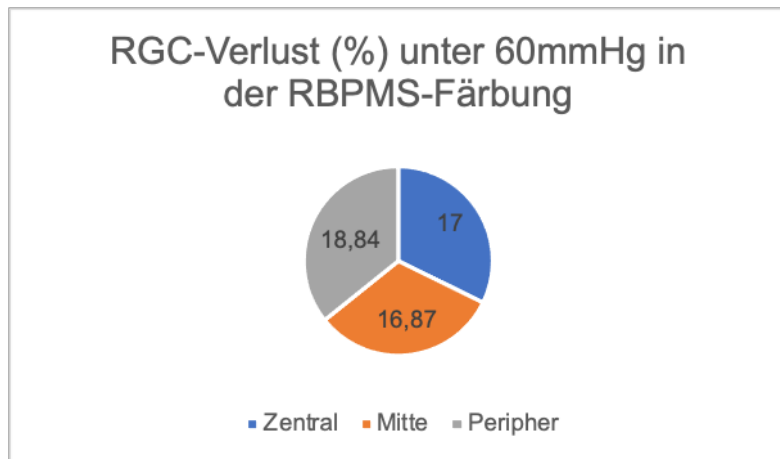


Abbildung 22

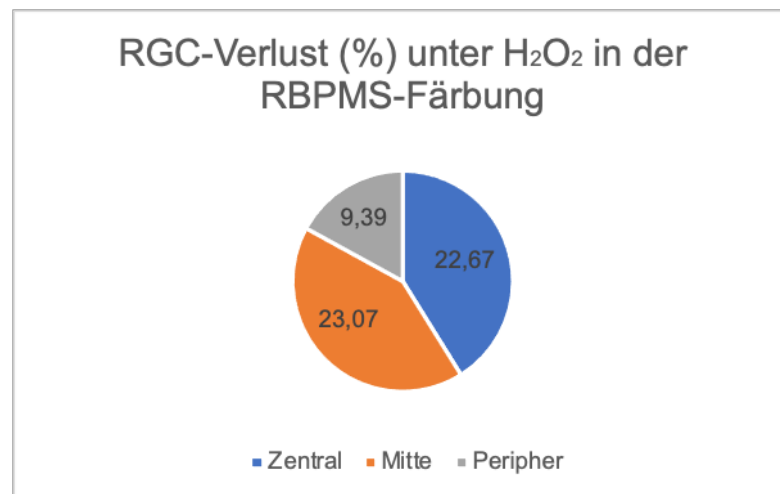


Abbildung 23

	Verlust (%) 60mmHg	Verlust (%) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Fluoreszenz- stärke (IntDen) 60mmHg	Fluoreszenz- stärke (IntDen) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Signifikanz 60mmHg zur Kontrollgruppe	Signifikanz H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> zur Kontrollgruppe	Signifikanz 60mmHg zu H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Zentral	57,43	82,58	150121,0	61443,7	–	–	–
Mitte	35,67	31,33	65981,3	69122,0	–	–	–
Peripher	62,67	29,72	29567,9	55578,7	p ≤ 0,01	–	–

Tabelle 6: Die Tabelle beschreibt den Verlust (%), die Stärke der Fluoreszenz/mm<sup>2</sup> (IntDen) sowie die Signifikanz der mit Neurofilament-H markierten Präparate. Dabei wird ersichtlich, dass Zentral einen deutlichen Verlust unter H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bedingungen aufwies, während Peripher einen signifikanten Verlust unter 60mmHg-Bedingungen aufwies.

### Stärke der Fluoreszenz der mit Neurofilament-H markierten Axone zentral, mittig und peripher

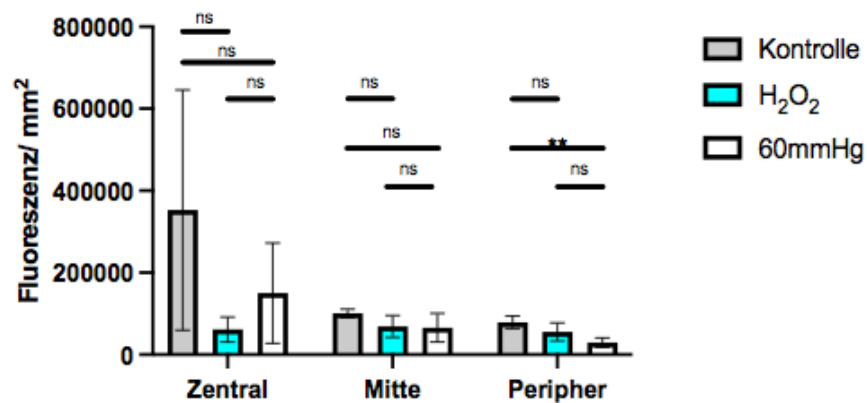


Abbildung 24



**Verlust der Fluoreszenz der mit Neurofilament-H markierten Axone  
zentral, mittig und peripher**

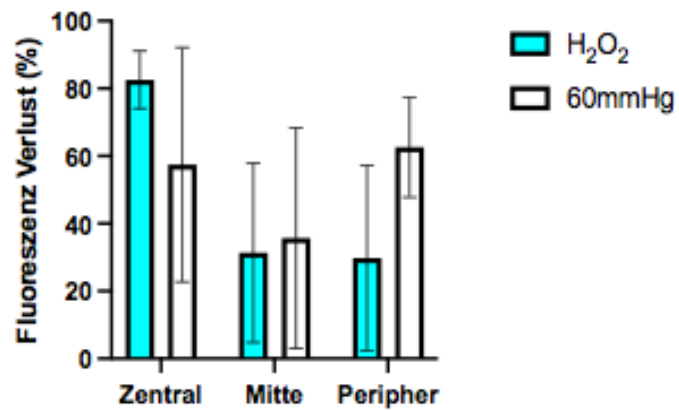


Abbildung 25

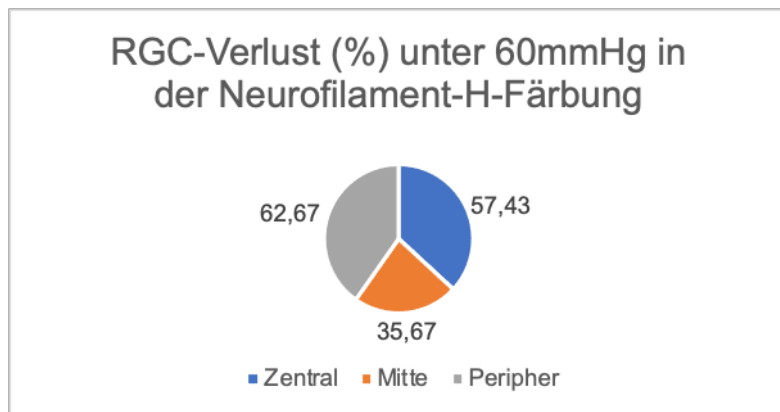


Abbildung 26

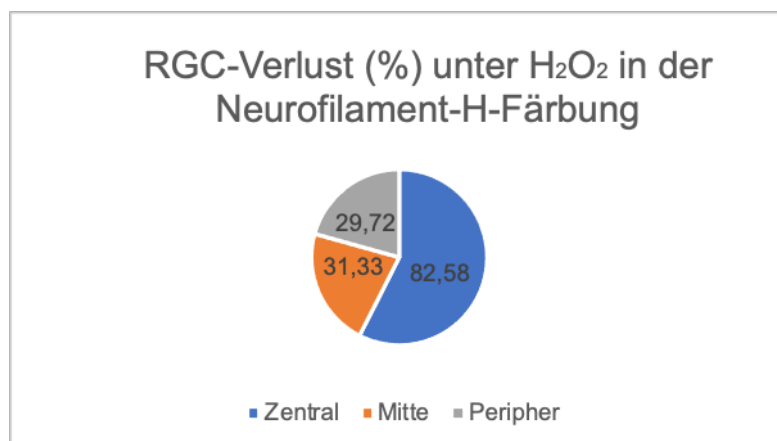


Abbildung 27

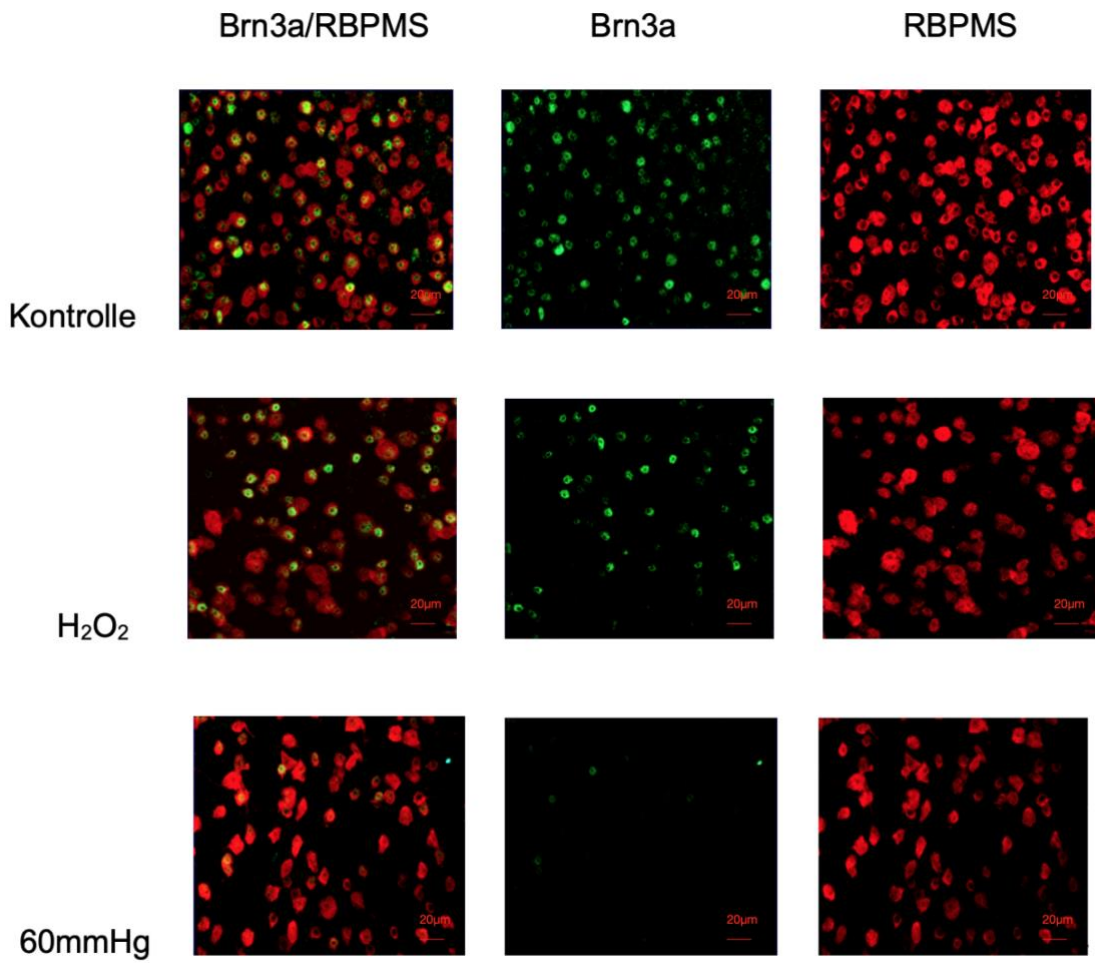


Abbildung 28: RGC-Färbungen mit Brn3a und RBPMS im temporalen Quadranten

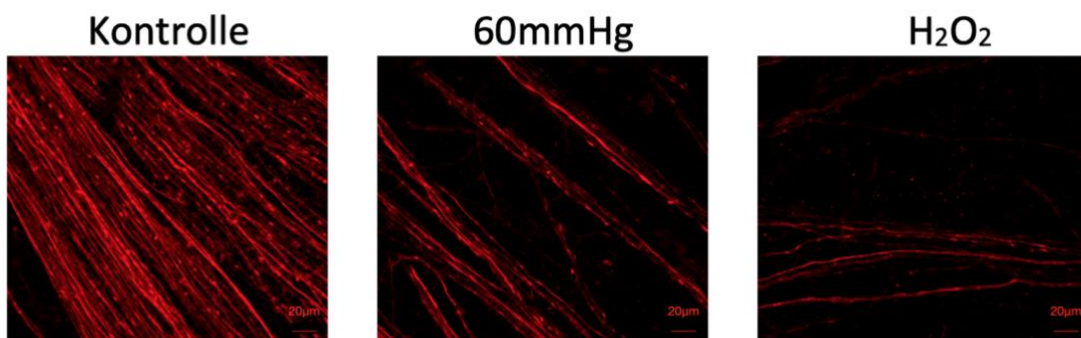


Abbildung 29: Axonfärbung mit Neurofilament-H im nasalen Quadranten

#### 4.1.6. Ergebnisse der 60mmHg- und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Präparate in der Brn3a-, RBPMS- und Neurofilament-H-Färbung in den Querschnitten

Auch im Querschnitt zeigte sich eine höhere Anfälligkeit der RGCs gegenüber 60mmHg (99,00%) als gegenüber H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (55,74%) in der Brn3a-Färbung.

In den mit RBPMS markierten Präparaten kam es zu einem Verlust von 66,70% in den 60mmHg-Präparaten während H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> einen Verlust von 40,80% verzeichnete.

In den Neurofilament-H-Präparaten war der Verlust unter 60mmHg-Bedingungen minimal höher als unter H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bedingungen (92,07% 60mmHg, 90,48% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

Es muss hier beachtet werden, dass die untersuchten Querschnitte aus jeweils unterschiedlichen Quadranten stammten und somit untereinander nicht direkt vergleichbar sind.

(Abbildung 30+Tabelle 7)

	Verlust (%) 60mmHg	Verlust (%) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	RGCs/mm <sup>2</sup> 60mmHg	RGCs/mm <sup>2</sup> H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Fluoreszenzstärke (IntDen) 60mmHg	Fluoreszenzstärke (IntDen) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Querschnitte RBPMS	66,70	40,80	6,00	10,67	–	–
Querschnitte Brn3a	99,00	55,75	0,33	9,00	–	–
Querschnitte Neurofilament	92,07	90,48	–	–	6000,33	7206,33

Tabelle 7: Die Tabelle beschreibt den Verlust, die Anzahl der RGCs/mm<sup>2</sup> und die Fluoreszenzstärke (IntDen) der Querschnitte.

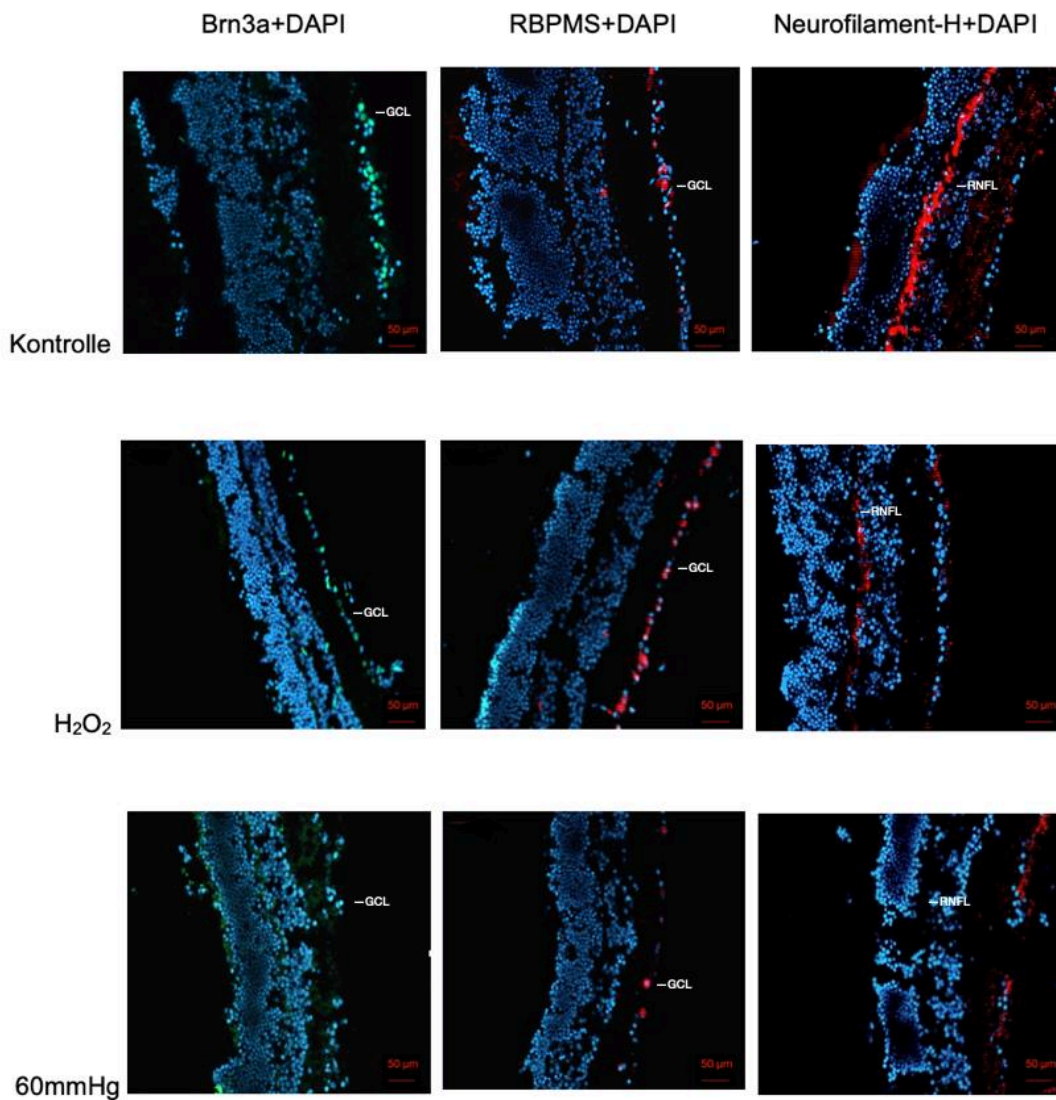


Abbildung 30: Querschnittsfärbungen mit Brn3a/RBPMS und DAPI

#### 4.1.7. Ergebnisse der 60mmHg- und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Präparate in der Brn3a-, RBPMS- und Neurofilament-H-Färbung abhängig vom Alter

Während in den nasalen und inferioren Quadranten ein kontinuierlicher Rückgang der RGC-Anzahl unter den RBPMS-Präparaten ersichtlich war, waren es in der Brn3a-Färbung alle Quadranten, die von einem altersabhängigen Rückgang betroffen waren. In den Neurofilament-H-Präparaten war ein Rückgang temporal und inferior ersichtlich, der jedoch nicht progressiv war. Die Mitte stellte im Vergleich zu Zentral und Peripher einen Rückgang dar.

Bezogen auf Zentral, Mitte und Peripher war in allen Färbungen kein altersabhängiges Rückgangsmuster ersichtlich.

(Abbildung 31-Abbildung 36)

**Altersabhängige Anzahl der RGCs in der Brn3a-Färbung temporal, superior, nasal und inferior**

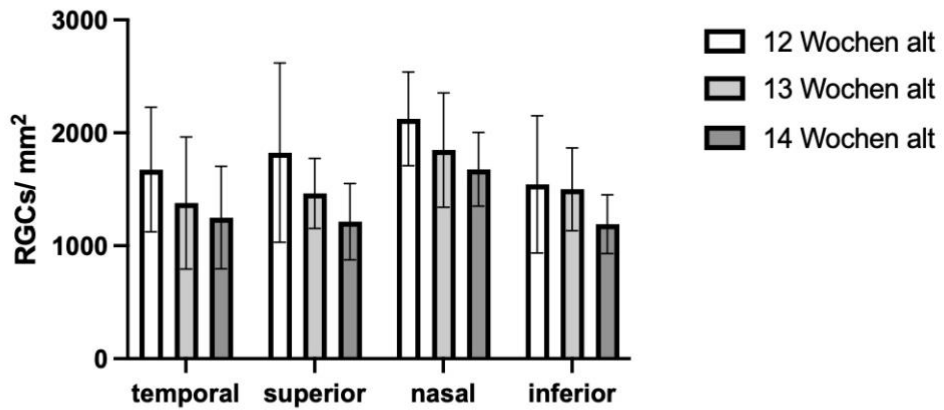


Abbildung 31

**Altersabhängige Anzahl der RGCs in der RBPMS-Färbung temporal, superior, nasal und inferior**

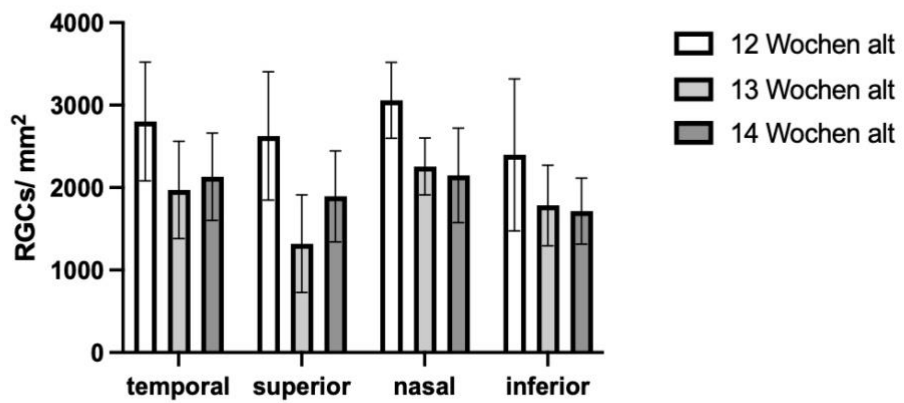


Abbildung 32

### Altersabhängige Anzahl der RGCs in der Brn3a-Färbung zentral, mittig und peripher

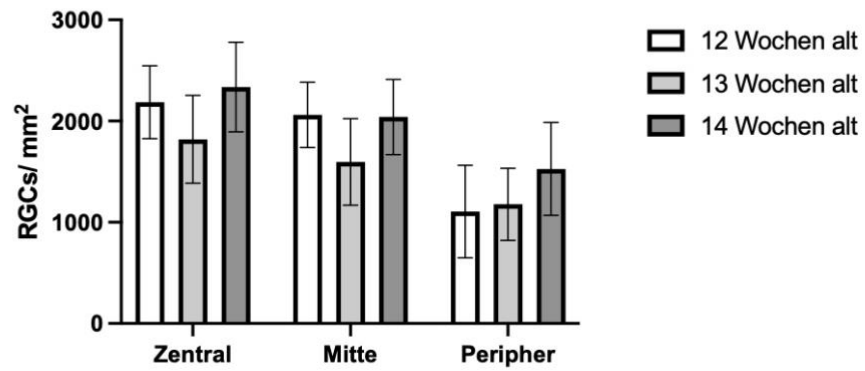


Abbildung 33

### Altersabhängige Anzahl der RGCs in der RBPMS-Färbung zentral, mittig und peripher

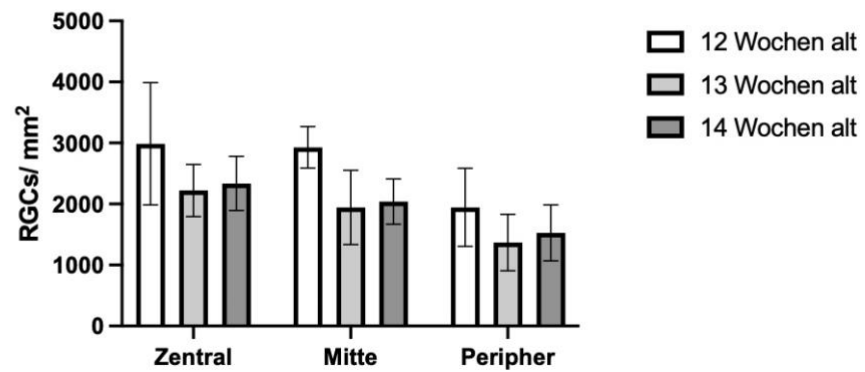


Abbildung 34

### Altersabhängige Fluoreszenzintensität der Axone in der Neurofilament-Färbung

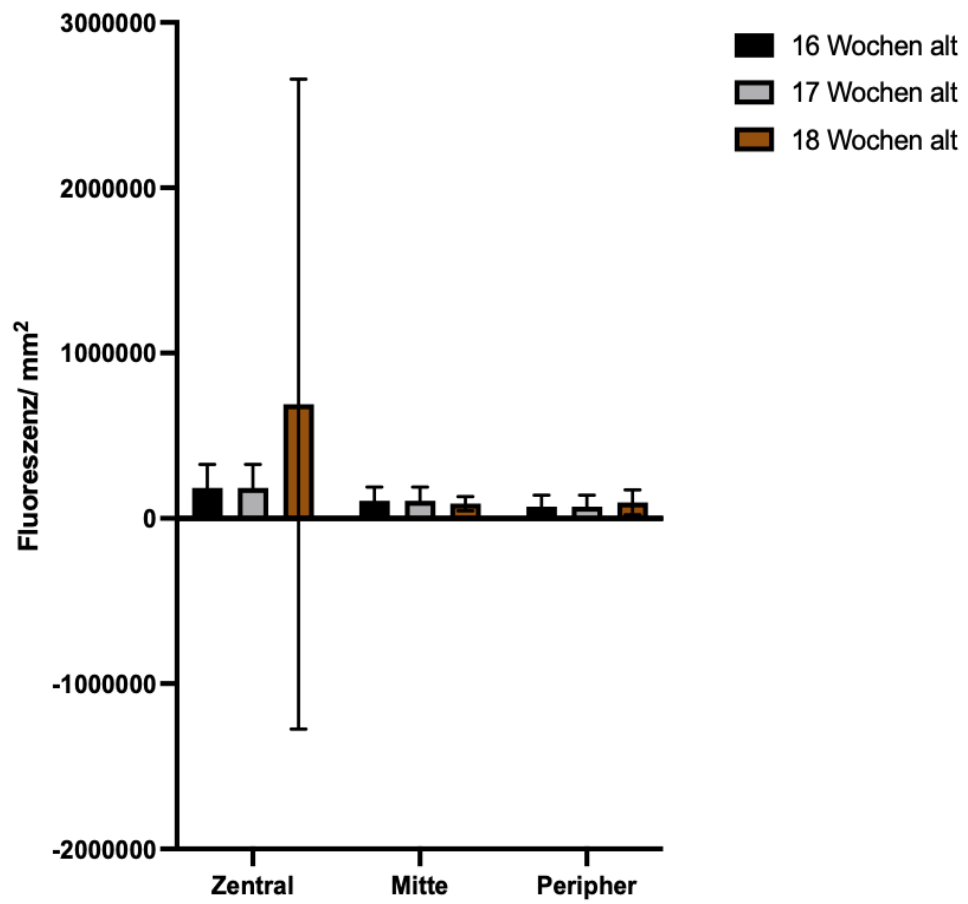


Abbildung 35

### Altersabhängige Fluoreszenzintensität der Axone in der Neurofilament-Färbung

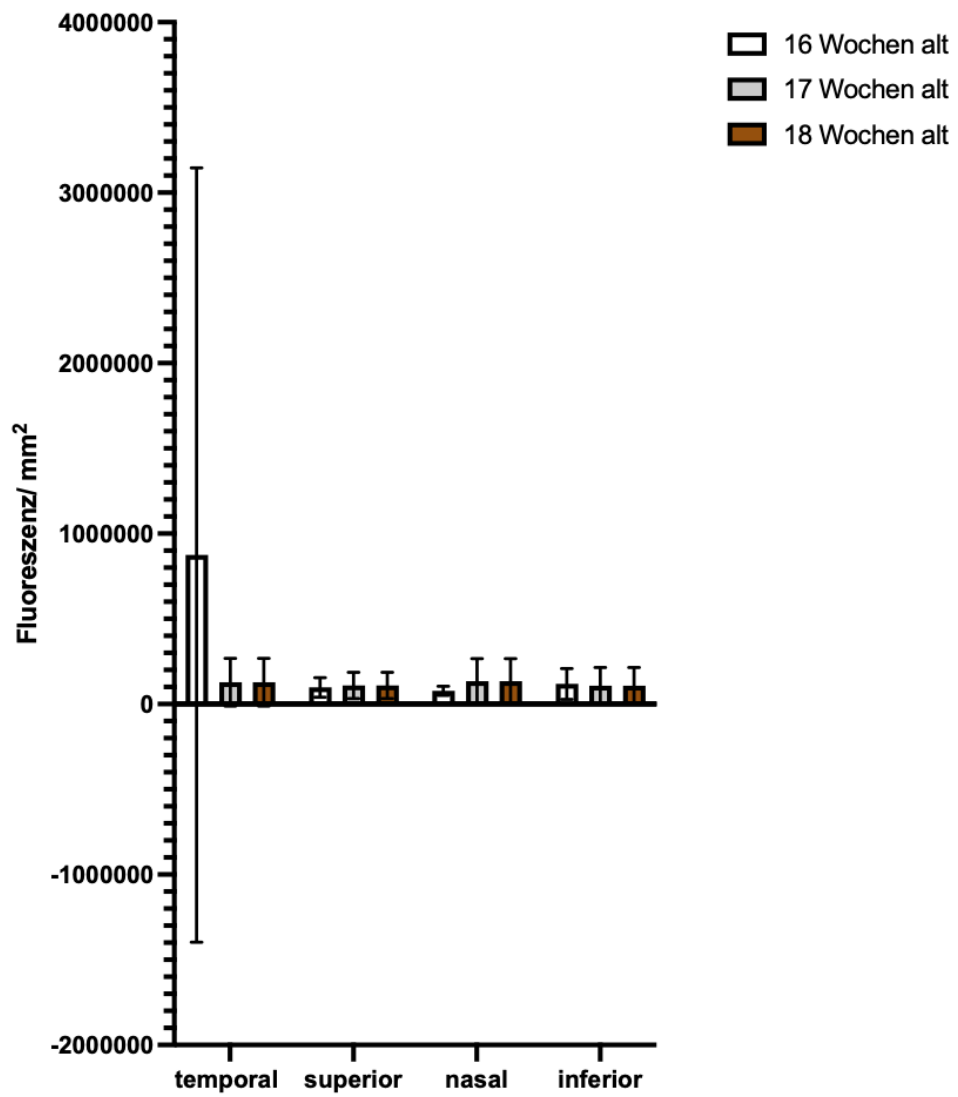


Abbildung 36



## 5. Diskussion

Das Glaukom wird meist mit einem erhöhten IOD assoziiert. Durch diesen kommt es zur Verschiebung von Lamellenblättern und zur Einengung der Sehnervenfasern.<sup>1 37</sup> Es sind jedoch auch andere pathologische Vorgänge an der Pathogenese des Glaukoms beteiligt.<sup>44</sup> Dass oxidativer Stress eine Rolle bei der Pathogenese einnimmt, stellt die Gefäßtheorie dar. Hierbei werden durch einen erhöhten IOD vaskuläre Abnormitäten ausgelöst, die den ROS-Spiegel ansteigen lassen.<sup>3</sup> Die erhöhte ROS-Konzentration kann jedoch auch durch mitochondriale Dysfunktionen entstehen.<sup>44</sup> Dass Endothelzellen und Arteriolen durch oxidativen Stress untergehen, gegenüber einem erhöhten IOD jedoch mit Dysfunktionen reagieren verdeutlicht, dass es unterschiedliche Degenerationsvorgänge innerhalb gleicher Zellgruppen gibt.<sup>3 4</sup>

Da der oxidative Stress, wie auch der erhöhte IOD, an der Pathogenese des Glaukoms beteiligt sind, möchten wir hier genauer auf die Degeneration der RGCs eingehen.

Da beim Normaldruckglaukom der erhöhte IOD keine Rolle spielt, müssen andere Vorgänge dominanter sein.<sup>1</sup> Somit ist beim Glaukom das Degenerationsmuster vielfältig und abhängig von der Pathogenese.

Durch die Färbungen werden oftmals strukturähnliche Zellen mit angefärbt, wodurch es zu fälschlichen Ergebnissen kommt. Aufgrund dessen muss die Auswahl der IHC-Färbung gut überdacht werden.

Um unserer Fragestellung nachzugehen, haben wir ein experimentelles Glaukommodell mit IHC-Färbungen angewendet, um Zellbestandteile der RGCs näher untersuchen zu können. Dabei haben wir den Nucleus, das Zytoplasma und die Axone betrachtet.

Unsere Untersuchung zielte dabei auf Differenzen in den Degenerationsmustern zwischen den Testgruppen oxidativer Stress ( $H_2O_2$ ) und erhöhter IOD (60mmHg).

Durch die Beantwortung unserer Frage kann die Diagnostik und somit die Therapie des jeweiligen Glaukom-Typen optimiert werden. Zudem können pathophysiologische Vorgänge in Zusammenhang gebracht und weitere Forschungsvorhaben optimiert werden.

Wie in unseren Ergebnissen beschrieben, zeigte sich in den Untersuchungen eine besondere Anfälligkeit der inferioren, superioren und temporalen retinalen Quadranten gegenüber 60mmHg. Dabei waren in der Brn3a-Färbung sogar alle vier Quadranten signifikant ( $p \leq 0,01$ ), in der Neurofilament-H-Färbung der inferiore Quadrant signifikant ( $p \leq 0,001$ ) betroffen. Temporal zeigte in der Neurofilament-H- und RBPMS-Färbung einen starken, jedoch nicht signifikanten Rückgang auf. Alle zentral, mittig und peripher gelegenen Bereiche waren in der Brn3a- (zentral:  $p \leq 0,001$ , mittig und peripher:  $p \leq 0,01$ ), die

peripheren Bereiche in der Neurofilament-H-Färbung ( $p \leq 0,01$ ) von einem signifikanten Rückgang gegenüber 60mmHg betroffen.

Die nasalen Quadranten waren unter  $H_2O_2$ -Bedingungen in der Brn3a- und RBPMS-Färbung signifikant ( $p \leq 0,05$ ) am stärksten betroffen. Die Neurofilament-H-Färbung zeigte temporal den stärksten Verlust gegenüber  $H_2O_2$  auf. Die zentralen und mittleren Bereiche waren unter  $H_2O_2$ -Bedingungen in der Brn3a- ( $p \leq 0,05$ ) und der RBPMS-Färbung anfällig, während in der Neurofilament-H-Färbung nur die Zentralen am anfälligsten waren.

Hauptergebnisse:

1. Es bestanden unterschiedliche Anfälligkeiten der Zellanteile der RGCs gegenüber erhöhtem Druck und oxidativem Stress.
2. Die mit Brn3a markierten Zellanteile waren gleichmäßig anfällig gegenüber erhöhtem Druck im gesamten Präparat. Verglichen mit den Neurofilament-H und RBPMS markierten Präparaten war Brn3a am stärksten generalisiert betroffen. Lediglich die Neurofilament-H-Präparate wiesen im temporalen und inferioren Quadranten eine prozentual höhere Anfälligkeit auf.
3. Die RBPMS- und Neurofilament-H-Präparate waren inferior, temporal und eher peripher anfällig gegenüber erhöhtem Druck. RBPMS wies die prozentual geringste Anfälligkeit auf.
4. Brn3a, RBPMS und Neurofilament-H waren zentral und nasal sehr anfällig gegenüber oxidativem Stress. Lediglich die Neurofilament-H-Präparate wiesen im temporalen Quadranten eine prozentual höhere Anfälligkeit auf.
5. Die Neurofilament-H-Präparate zeigten die prozentual höchste Anfälligkeit gegenüber oxidativem Stress im Vergleich zu Brn3a und RBPMS.

Eine Untersuchung aus dem Jahr 1991 zeigte, dass es einen signifikant linearen Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Axonschädigung im N.opticus und der Anzahl der geschädigten Ganglienzellen in den korrelierenden Retinabereichen gab.<sup>73</sup> Ebenso wurde die Messung der RNFL-Dicke als Methode zur Quantifizierung der RGCs dargestellt.<sup>57</sup> Aufgrund dieser Informationslage können Studien der axonalen Schädigung auch zum Vergleich der RGC-Schädigung herangezogen werden.

Untersuchungen der RNFL-Dicke anhand eines Stratus-OCTs zeigten, dass die supero-temporalen und infero-temporalen Areale der peripapillären RNFL beim Glaukom am

stärksten von einer Ausdünnung betroffen waren.<sup>74</sup> Ebenso zeigten der inferiore und der superiore Quadrant des N. opticus Veränderungen.<sup>75</sup> Die 6-Uhr Position der makulären NFL-Dicke war bei glaukomverdächtigen im Vergleich zu normalen Augen signifikant betroffen. Zudem korrelierten die anfälligen Bereiche der RNFL mit angegebenen Gesichtsfeldausfällen.<sup>74</sup> Diese Erkenntnis lässt sich mit unseren 60mmHg-Ergebnissen in Zusammenhang bringen, auch wenn hier die Methoden voneinander abweichen.

Womöglich gibt es auch Unterschiede zwischen Augen mit einem erhöhten IOD und Augen mit der Diagnose Glaukom, aus welchem Grund sich die Muster zwischen den Studien mit angewandtem Druck nicht immer gleichen:

Bowd et al. untersuchten die RNFL-Dicke mit einem OCT, um Unterschiede zwischen normalen, hypertensiven und glaukomatösen Augen zu finden. Im Jahr 2000 beschrieben sie in ihrer Veröffentlichung, dass Patienten mit einem Offenwinkelglaukom im Vergleich zu hypertensiven Augen und zu unbehandelten Kontrollaugen eine Ausdünnung der gesamten Fläche der RNFL aufwiesen. Diese Ausdünnung zeigte ein statistisch signifikantes Ergebnis. Bei Betrachtung der Quadranten zeigte die glaukomatös geschädigte temporale RNFL sowie die glaukomatös geschädigte superiore RNFL gegenüber hypertensiven als auch normalen Augen eine signifikante Ausdünnung. Interessanterweise war die RNFL der hypertensiven Augen im Vergleich zur Kontrolle im inferioren und nasalen Quadranten signifikant ausgedünnt.<sup>76</sup> Anhand dieser Ergebnisse lässt sich feststellen, dass es Unterschiede zwischen glaukomatösen und hypertensiven Augen gibt. Zur Unterscheidung wiesen die hypertensiven Augen der Testgruppen dabei einen Druck von 24mmHg oder mehr auf. Die glaukomatösen Augen ebenfalls, jedoch u.a. auch eine Ausdünnung des Randsaumes.<sup>76</sup> Somit muss es bei den glaukomatösen Augen neben dem erhöhten IOD noch einen weiteren Faktor geben, wie unter anderem den oxidativen Stress, der zu denen das Glaukom kennzeichnenden Schäden führt.

Es gibt viele Projekte, die überprüfen, welche Substanzen den oxidativen Stress im Glaukom abfangen und wie man im Feld der Neuroprotektion die RGCs schützen kann.<sup>77 78</sup> <sup>79</sup> Zudem gibt es einige Hinweise, dass oxidativer Stress besonders beim Normaldruckglaukom eine herausragende Rolle spielt.<sup>80 81 82</sup> Jedoch fanden wir keine Studien über Untersuchungen, in welchen Anteilen der Retina die RGCs durch den oxidativen Stress untergehen, um unsere Ergebnisse zu vergleichen.

Die Vermutung liegt nahe, dass es zwischen Normaldruckglaukom und Hochdruckglaukom Unterschiede im Verlustmuster gibt. Yum et al. berichteten jedoch über ähnliche RNFL-Defekte im Normaldruckglaukom wie Bowd et al. zum Offenwinkelglaukom: Untersuchungen von Patienten mit temporalen und supero-temporalen oder infero-temporalen RNFL-Defekten im Normaldruckglaukom zeigten interessanterweise, dass die temporalen Areale signifikant dünner waren als die supero- und infero-temporalen Areale der RNFL.<sup>83</sup> Genauso

beschrieben Schiefer et al. und Araie et al. mehr signifikante Defekte des Gesichtsfeldes im oberen Hemifeld. Bei Schiefer et al. bezogen sich die Defekte jedoch auf Hoch- und Normaldruckglaukome, während Araie et al. diese für das Normaldruckglaukom angaben.<sup>84</sup> <sup>85</sup> Daraus erschließt sich eine höhere Anfälligkeit des unteren Sektors der Retina, wie auch des N. opticus, jedoch unabhängig vom Glaukومتyp. Außerordentlich wenig wurden Defekte im temporalen Gesichtsfeld beschrieben. Wenn sie dort auftraten, dann eher im oberen als im unteren Hemifeld.<sup>86</sup> Diese Erkenntnis deckt sich genau mit unseren Ergebnissen, dass die nasale Retina unter erhöhtem IOD nicht so anfällig war wie die anderen Quadranten. Dennoch war sie signifikant verringert zur Kontrolle in der Brn3a-, nicht jedoch in der RBPMS- und Neurofilament-H-Färbung.

Trotz der angegebenen Korrelation zwischen Axon- und RGC-Verlust sind laut den Ergebnissen von Lee et al. RNFL-Untersuchungen nicht mit RGC-Verlusten gleichzusetzen: Sie analysierten Unterschiede im Muster des RGC-Verlustes zwischen kompressiver und glaukomatöser optischer Neuropathie. Dazu untersuchten sie die Dicke der makulären Ganglienzellschicht (mGCL) und der makulären retinalen Nervenfaserschicht (mRNFL) anhand eines OCTs. Inferior und temporal gab es im äußeren Anteil eine signifikante Ausdünnung der mGCL und der mRNFL beim POWG. Im inneren Anteil der gleichen Felder gab es auch in der mGCL eine signifikante Ausdünnung ( $p \leq 0,001$ ).<sup>13</sup> So zeigten die Brn3a-, RBPMS- und Neurofilament-H-Ergebnisse bei uns ähnliche Muster. Es sollte beachtet werden, dass Lee et al. die inferioren und superioren Bereiche nicht noch in nasal und temporal differenzierten. In der mRNFL waren die äußeren superioren und äußeren nasalen Anteile ebenfalls signifikant ausgedünnt ( $p \leq 0,05$ ). In der mGCL waren die gesamten superioren und nasalen Anteile signifikant ausgedünnt ( $p \leq 0,05$ ), was dafür spricht, dass die RGCs zuerst untergingen und anschließend die Axone.<sup>13</sup> Andere Studien behaupten das Gegenteil.<sup>87</sup> <sup>88</sup> Die Anzahl der zugrunde gegangenen Axone entsprach in weiteren Untersuchungen nicht denen der RGCs. Die Axone wiesen eine höhere Verlustanzahl zu einem definierten Zeitpunkt auf.<sup>89</sup> Interessanterweise gibt es Hinweise, dass die Degeneration von RGC-Somata und deren Axone gleichzeitig und nicht nacheinander stattfindet. Diese Erkenntnis bezieht sich aber auf ein experimentelles Modell an Ratten, in dem eine Transektion durchgeführt wurde.<sup>90</sup> Ob dies auch auf ein experimentelles Glaukommodell an Mäusen bezogen werden kann, ist unklar. Dies widerspricht wieder der Ansicht, dass RNFL-Studien auch zum Vergleich eines RGC-Verlustes herangezogen werden können und spiegelt die Schwierigkeit dieses Themenfeldes wieder.<sup>73</sup>

Eine weitere Studie beschrieb einen Ausgleich des Axonverlustes durch eine Zunahme des nichtneuronalen Gewebes in der RNFL im Alter.<sup>91</sup> Dies könnte ebenfalls die gesamten Ergebnisse beeinflussen, wenn unterschiedlich alte Mäuse zwischen den Studien verwendet wurden.

Trotz des Widerspruchs zur Auffassung von Glovinsky et. al. können die Ergebnisse von Lee et al. auch teilweise mit unseren Ergebnissen der RGCs und Axone verglichen werden.<sup>13 73</sup>

Ähnliche Ergebnisse zeigten auch Untersuchungen des Musters der Ganglienzellschädigung beim POWG: Die RNFL-Dicke wurde hier in Quadranten, gesamt und in 12-Uhr-Positionen untersucht. Hier war die RNFL-Dicke im Vergleich zur Kontrolle in allen Uhrzeitpositionen signifikant dünner, wobei der superiore und inferiore Quadrant sowie die Uhrzeiten 6-7 Uhr und 11-12 Uhr davon am stärksten betroffen waren.<sup>92</sup>

Untersuchungen der RGC+-Schicht (retinal ganglion cell layer plus inner plexiforme) zeigten eine ausgeprägtere Ausdünnung in den inferioren Sektoren der Retina, ebenso die Untersuchungen der RNFL-Schicht.<sup>93</sup> Hier gibt es Gemeinsamkeiten mit unseren Ergebnissen der untersuchten Schichten, wie auch Lee et al. es für den inferioren Quadranten beschrieben.<sup>13</sup> Die RGC+-Schicht war im temporalen Anteil stärker ausgedünnt gegenüber glaukomatösen Schädigungen als im nasalen Anteil.<sup>93</sup> Ebenso zeigten die infero-temporalen Areale Anfälligkeiten.<sup>93 94</sup>

Dass Sehnervenaxone der oberen und unteren Quadranten des N. opticus peripher einen stärkeren Verlust beim Glaukom aufwiesen als die Fasern der nasalen und temporalen Quadranten, kann mit den oben genannten Studien und zum Teil mit unseren Ergebnissen identifiziert werden. Diese primär anfälligen Bereiche des N. opticus beinhalten Fasern des Arkusbereiches, die bei einem chronischen Glaukom anfälliger für Schäden waren.<sup>95</sup>

Ebenso führte ein erhöhter IOD zu strukturellen Abweichungen um den Sehnervenkopf und könnte somit negative Folgen für die RGCs haben.<sup>96 97</sup>

Betrachtet man die Morphologie der Lamina cribrosa, weist diese inferior und superior ein instabileres Bindegewebegerüst, größere Poren und somit möglicherweise anfälliger Bereiche gegenüber Druck auf.<sup>98</sup> Dies würde zumindest unsere anfälligen Bereiche gegenüber Druck in der Brn3a-Färbung erklären. Für unsere Ergebnisse der RBPMS- und Neurofilament-H-Färbung stimmte der inferiore Anteil überein.

Womöglich gibt es auch Unterschiede durch die Länge der Druckaussetzung, die wir jedoch nicht untersuchten: 1998 wurden bereits zeitliche Untersuchungen des Musters des RGC-Verlustes im Glaukom an Ratten durchgeführt, die unterschiedliche Ergebnisse zeigten. Im frühen Glaukom wiesen die Präparate, die einem erhöhten Druck ausgesetzt wurden, Verluste der RGCs in den zentralen sowie peripheren Anteilen auf. Nach 4-6 Wochen Druckaussetzung waren jedoch eher die peripheren Anteile betroffen. Hier wird ein linearer Zusammenhang zwischen dem prozentualen RGC-Verlust und der Länge der Druckaussetzung vermutet.<sup>12</sup>

Bei Betrachtung der peripheren und zentralen retinalen Bereiche in Bezug auf RGC-Anfälligkeiten gegenüber Druck zeigte die Peripherie Schwächen, wobei auch über zentrale Anfälligkeiten berichtet wurde. In der Studie von van der Merwe et al. waren die

Anfälligkeiten für die zentralen und peripheren, in der Studie von Tong et al. für die peripheren Bereiche signifikant.<sup>99 100</sup> Bei van der Merwe et al. wurde die Retina jedoch nicht noch in zu untersuchende mittlere Bereiche aufgeteilt.<sup>99</sup> Hier gibt es wieder Gemeinsamkeiten mit unseren Druckergebnissen, hauptsächlich jedoch in der Brn3a-Färbung.

Womöglich gibt es somit auch Unterschiede in verschiedenen Stadien des Glaukoms: Studien, bezogen auf den Verlust von Axonen im N. opticus, berichteten über signifikante Anfälligkeiten der temporalen und superioren Quadranten unter den Präparaten, die ein höheres IOD-Expositionsniveau hatten. Unter niedrigem positiven integral IOD wiesen die inferioren und nasalen Quadranten Anfälligkeiten auf. Es muss berücksichtigt werden, dass diese Daten von Präparaten des Mausstammes CD1 stammten.<sup>101</sup> Die Auswirkung von einem niedrigen IOD-Expositionsniveau und der daraus resultierenden nasalen Anfälligkeit könnte jedoch erneut unsere Vermutung unterstützen, dass das Normaldruckglaukom eher eine Anfälligkeit gegenüber oxidativem Stress zeigt, da auch bei uns der nasale Quadrant in der Brn3a-, RBPMS- und Neurofilament-H-Färbung signifikant anfällig gegenüber H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> war. Inferior war in unseren Untersuchungen unter 60mmHg am meisten Verlust, bei Schaub et al. jedoch unter niedrigem IOD-Expositionsniveau.<sup>101</sup> Somit ist die Schwierigkeit gegeben, dass Ergebnisse oftmals nicht verglichen werden können aufgrund unterschiedlicher Glaukommodelle bezogen auf die Stadien des Glaukoms und der Länge der Druckaussetzung. Dies alles muss bei Gegenüberstellungen verschiedener Studien berücksichtigt werden.

Die Behauptung, dass oxidativer Stress im Normaldruckglaukom eine größere Bedeutung hat, könnte mit unseren Ergebnissen im Vergleich zu Yum et al. und Schiefer et al. jedoch in Zusammenhang gebracht werden, da sich die Muster des RGC-Verlustes zwischen erhöhtem Druck und oxidativem Stress deutlich unterscheiden.<sup>83 84</sup>

Ebenso korrelierten unsere Ergebnisse für den oxidativen Stress näherungsweise mit den Ergebnissen von Untersuchungen des Normaldruckglaukoms: Es lagen beim Normaldruckglaukom vorwiegend lokalisierte und zentral gelegene Defekte in Struktur und Funktion vor im Vergleich zum Hochdruckglaukom. Diese waren in den zentralen superioren und zentralen inferioren Feldern signifikant.<sup>102</sup>

Ohne eine Neuroprotektion gegen oxidativen Stress im Normaldruckglaukom kam es zu einem signifikanten Verlust der RGCs.<sup>80</sup> Die Konzentrationserhöhung an durch oxidativem Stress geschädigter DNA/RNA durch einen gesteigerten IOD verdeutlicht, dass es unabhängig vom Druck oxidativ geschädigte DNA/RNA gab und diese durch den IOD noch erhöht wurde.<sup>103</sup>

Die Induktion des oxidativen Stresses durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wurde in anderen Studien erfolgreich erprobt.<sup>79 104</sup> Unsere AG berichtete bereits 2017 über einen signifikanten Verlust von Brn3a+

RGCs auf oxidativen Stress. Hier wurde mit 100mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> über 24 Stunden gearbeitet. Diese Studie wurde jedoch an Ratten durchgeführt.<sup>104</sup>

Womöglich gibt es aber auch Zusammenhänge zwischen hypertensiven Augen und dem Verlustmuster unter H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Bedingungen, da in der Studie von Bowd et al. der nasale Quadrant signifikant betroffen war.<sup>76</sup> Dies würde unserer Vermutung jedoch widersprechen. Die differenten Ergebnisse könnten sich darauf belaufen, dass die Druckimitationen zwischen den Studien ex vivo und in vivo durchgeführt wurden. Zudem gibt es unterschiedliche Mäusestämme, wodurch sich die Differenzen in der Zellzahl erklären könnten.<sup>105</sup> So zeigte eine Studie, dass der RGC-Verlust bei C57-Mäusen diffus war, während er bei der gleichen Methode bei DBA-Mäusen ein fokales Muster aufwies.<sup>106</sup> Dies könnte erklären, dass Ergebnisse zwischen unterschiedlichen Studien variieren. Jedoch können sie gute Aussagen zwischen unterschiedlichen Testgruppen innerhalb einer Studie mit derselben Gattung oder zwischen Studien derselben Gattung treffen.

Das Geschlecht stellt einen Risikofaktor für das Glaukom dar.<sup>6</sup> Dadurch können die Ergebnisse zwischen den Studien oftmals nicht gleichgesetzt werden, wenn die Experimente an gemischtgeschlechtlichen Testgruppen durchgeführt wurden. Mäuse weiblichen oder männlichen Ursprungs wiesen keinerlei Differenzen in der RGC-Anzahl in den Kontrollgruppen innerhalb eines Stammes auf. Jedoch könnte dies im experimentellen Glaukommodell der Fall sein.<sup>105</sup>

Die in unserem Projekt durchgeführte Methode mit der Anwendung von 60mmHg wurde von mehreren Studien bereits erfolgreich durchgeführt und erprobt. Sie zeigten einen signifikanten RGC-Verlust.<sup>107 108</sup>

Bei den einzelnen Testgruppen sollte immer berücksichtigt werden, dass nicht nur die RGCs den Testliquiden ausgesetzt wurden, sondern das gesamte Präparat. Somit können sich die Testliquide auch auf andere Zellen auswirken. Unspezifische Funktionsveränderungen der Zellen traten bei einem akuten Druck über 50mmHg auf.<sup>109</sup> Diese Erkenntnis stellt dar, dass unterschiedlich hohe Drücke ebenfalls unterschiedliche Auswirkungen haben. Dass die RGCs jedoch noch empfindlicher waren als deren umliegende Zellen, zeigte die Studie von Bui et al., in der die RGCs bereits bei akuten Drücken von 30-50mmHg funktionelle Einschränkungen aufwiesen.<sup>109</sup> Die bereits erwähnten Studien mit Drücken über dem Schwellenwert von 50mmHg müssten laut dieser Erkenntnis infrage gestellt werden. Jedoch muss hier auch wieder die Methode berücksichtigt werden, da es sich bei Bui et al. um einen akuten Druck handelte. Die funktionellen Veränderungen der Retina unter akutem Druck folgten einem Muster von zentral nach peripher.<sup>109</sup> Dies deutet darauf hin, dass die Empfindlichkeit an den zentralen Stellen höher war. Unsere Ergebnisse zeigten jedoch nur in der Brn3a-Färbung eine erhöhte Empfindlichkeit in den zentralen Bereichen. Zudem konnten wir mit unseren Färbungen keine Funktionsveränderungen untersuchen.

Bezogen auf die Größe der zugrunde gehenden RGCs und Axone im Glaukom konnte festgestellt werden, dass größere RGCs und größere Axone anfälliger gegenüber erhöhtem Druck waren.<sup>73 110 111</sup> Gleichzeitig wurde über größere RGCs im temporalen Bereich und über mehr Verluste großer Zellen im unteren Anteil der Retina berichtet.<sup>112</sup> Bemerkenswerterweise waren die großen Zellen signifikant anfälliger gegenüber Druck und die untere Retina war stärker geschädigt. Axone in den dazugehörigen Retinaarealen zeigten ebenso einen Untergang unter Druck, davon besonders die großen Axone.<sup>73</sup> Diese Untersuchung zeigte erneut, dass die Muster der RGC- und Axonanfälligkeiten zusammenhängen.

Da es hier eine Korrelation zwischen der Größe und der Anfälligkeit der Zellen gab, können Studien zur Untersuchung der Anfälligkeit der Zellgröße auch für unsere Untersuchungen zum Vergleich herangezogen werden.

Dass sich überhaupt morphologische Veränderungen, wie eine Verringerung des Somavolumens und der Zellfortsätze vor dem Tod der RGCs sehen lassen, wurde bereits 1998 herausgefunden: Es kam vor dem RGC-Tod zu einem signifikanten Untergang der Dendriten mit einem anschließenden signifikanten Volumenverlust des Somas.<sup>87</sup>

Die mikroskopische Untersuchung des N. opticus zeigte, dass dieser große Fasern in höherem Maße in der Peripherie und im nasalen Anteil aufwies.<sup>110</sup> Anhand der Ergebnisse der anderen Studien müssten die Peripherie und der nasale Anteil somit anfälliger gegenüber Druck sein. Die Studie von Quigley et al. zeigte einen Verlust der peripheren Fasern des N. opticus in den inferio-nasalen und superio-nasalen Sektoren unter Druck. Die Axongröße war in den glaukomatösen Augen signifikant kleiner als in den Kontrollgruppen.<sup>110</sup> Dieses Ergebnis widerspricht unserer Vermutung, wie auch unseren Ergebnissen, dass der nasale Anteil unter Druck nicht so stark anfällig ist.

Im Hinblick auf die zeitliche Anfälligkeit der Fasergröße berichtete eine Studie, dass die Fasern, die größer als der mittlere Durchmesser waren, schneller abgetötet wurden. Kleinere Fasern wurden auch abgetötet, jedoch größtenteils erst zu einem späteren Zeitpunkt.<sup>111</sup> Die Vermutung, dass es Unterschiede in den Mustern der Studien gibt, in Abhängigkeit davon wie lange Präparate einem Druck ausgesetzt waren, deckt sich mit den Untersuchungen von Laquis et al..<sup>12</sup>

Van der Merwe et al. benutzten in ihrer oben genannten Studie zur Darstellung der RGCs die RBPMS- und Brn3a-Färbung. Sie hatten jedoch im Gegensatz zu uns einen signifikanten Rückgang in den Ergebnissen beider Färbungen. Die Druckerhöhung betrug bei ihnen bis zu 130mmHg für 60 Minuten in vivo.<sup>99</sup> Wir wendeten nur 60mmHg an, jedoch über 24 Stunden. Es könnte sein, dass 130mmHg zu aggressiv für die Präparate waren, wenn man den Erkenntnissen von Bui et al. folgt.<sup>109</sup> Dies könnte die Differenzen zwischen den jeweiligen Ergebnissen erklären.



Es gibt Hinweise auf einen progressiven Zusammenhang zwischen einem Druckanstieg und einem Verlust der Brn3a-Expression in gefärbten Netzhäuten. Dieses Phänomen wurde jedoch in DBA2-Mäusen festgestellt.<sup>64</sup> Brn3a wurde zum Teil aber als ungeeigneter Marker dargestellt, da seine Expression im Zuge der IOD-Erhöhung abnahm.<sup>113</sup> Die rechtzeitige Drucksenkung ist daher essenziell, um eine Neuroprotektion zu bewirken. Ob diese Feststellungen auch auf die Brn3a+ Zellen von BLJ-Mäusen bezogen werden können, ist fraglich.

Weitere Studien berichteten über eine Abwärtsregulierung der Brn3a-Expression schon bevor der RGC-Tod eintrat.<sup>9 59 65</sup> Diese Ergebnisse könnten für eine gewisse Toleranz der Brn3a+ Zellen gegenüber Verletzungen zeigen, jedoch nicht der Expression des Markers. Fälschlicherweise kann es hier zu einer Überschätzung der RGC-Zahl kommen. Jedoch werden durch diese Ergebnisse auch die Funktionstüchtigkeit und Zuverlässigkeit des Markers infrage gestellt. Ebenso durch die Erkenntnis, dass falsche Aussagen über die Anzahl von RGCs getroffen werden, da die Brn3a-Expression der RGCs unter Stress abnahm, nicht jedoch die RGC-Anzahl.<sup>50</sup>

Im Vergleich gibt es aber auch Informationen, die von Brn3a genau das Gegenteil beweisen und stellen die Studienergebnisse von Barabas et al.<sup>64</sup> und Nadal-Nicolas et al.<sup>9 59</sup> infrage: Es wurde angegeben, dass Brn3a verspätet reduziert auftrat, obwohl vorher schon ein erhöhter IOD in den zu untersuchenden Präparaten festgestellt wurde. Hier wurde jedoch das Engwinkelglaukom untersucht.<sup>66</sup>

Obwohl Brn3a nur 96% der Brn3+-Zellen und nur 80-90% der rückmarkierten RGCs mit FG markierte, wurde Brn3a als Marker zur Beurteilung von RGCs gerne präferiert und stellte sich als zuverlässiger Marker zur Beurteilung von RGCs dar.<sup>9 58 59 60 61 62 67</sup>

Im Vergleich mit einer Rückfärbung mittels Melanopsin waren nach ONC 99% der mit Brn3a markierten RGCs tot, jedoch nur 60% der mit Melanopsin rückmarkierten RGCs.<sup>114</sup> Melanopsin machte die ip-RGCs sichtbar, die wohl mit Brn3a nicht markiert wurden. Diese Subpopulation kann somit in Projekten mit Brn3a-Markierung nicht berücksichtigt werden und zu falschen Ergebnissen führen.<sup>57</sup> Somit konnten auch wir anhand der Brn3a-Färbung keine Aussagen über den Verlust von ip-RGCs treffen. Da Brn3a jedoch die OFF-RGCs sichtbar macht, lässt anhand unserer Ergebnisse auf einen stärkeren Verlust der OFF-RGCs gegenüber erhöhtem Druck schließen.<sup>52 63</sup>

Für die RBPMS-Färbung sahen die Zahlen wieder anders aus: Die Rückmarkierung mit FG zeigte, dass 99,5% der FG+ RGCs auch RBPMS+ waren.<sup>10</sup> Die unterschiedlichen Färbungen waren zudem notwendig, da RBPMS+ Zellen nur zu 80% Brn3a exprimierten.<sup>60</sup> Dies stimmt mit dem Ergebnis überein, dass Brn3a nur 80% der RGCs markierte, während RBPMS alle Subtypen aber keine verdrängten amakrinen Zellen markierte.<sup>50 60</sup> Somit scheint RBPMS Subpopulationen zu markieren, die Brn3a nicht markiert. Diese könnten ip-RGCs sein,

jedoch nicht ausschließlich.<sup>60</sup> RBPMS scheint somit ein zuverlässiger Marker zur Quantifizierung der RGCs zu sein und sollte als Marker zur Zählung aller RGCs bevorzugt werden.<sup>57 60</sup> Folgt man der Erkenntnis, dass die M4 ip-RGCs den ON-s RGCs entsprechen und diese eher temporal und peripher gelegen sind, lässt sich anhand unserer Ergebnisse darauf schließen, dass die M4 ip-RGCs anfälliger gegenüber erhöhtem Druck waren als gegenüber oxidativem Stress.<sup>52 60</sup>

Ein Nachteil von RBPMS für unser Projekt war die Fähigkeit der Markierung von lebenden und lädierten RGCs nach ONC und okulärer Hypertension.<sup>57</sup> Während Brn3a ein rückläufiges Muster nach Verletzungen darstellte, blieb RBPMS stabil.<sup>60 115</sup> Unsere Ergebnisse zeigten in der RBPMS-Färbung gegenüber 60mmHg keinen signifikanten Unterschied zur Kontrolle, jedoch in der Brn3a-Färbung.

Brn3a ist auf den Nucleus beschränkt und wird als Nucleusfärbung, RBPMS als zytoplasmatische Färbung bezeichnet.<sup>10 50</sup> RBPMS ist aber auch im Nucleus lokalisiert.<sup>10 57</sup> Mead et al. berichteten, dass RBPMS hauptsächlich im Nucleus aber nicht ausschließlich dort lokalisiert war.<sup>57</sup> Dies macht die einheitliche und somit gleichmäßige Markierung, wie dies bei Brn3a der Fall ist, schwieriger.

Der Vorteil von Brn3a ist seine spezifische Nucleusfärbung. Dadurch konnten RGCs auch unter hoher Zelldichte gut identifiziert werden. Zudem markierte er keine Astrozyten, amakrinen Zellen oder Makrophagen.<sup>50 61</sup> Aufgrund dessen ist er gut zur automatischen Zählung durch bestimmte Softwareprogramme geeignet.<sup>50</sup>

Es wurden diverse Methoden zur Quantifizierung von Axonen oder RGCs angewendet: Kwong et al. und Zhao et al. zählten die Somata in ihren Studien manuell.<sup>10 116</sup> Dies hatte insbesondere mit der RBPMS-Färbung zu tun, da diese Markierung die vollautomatische Zählung erschwerte.<sup>50</sup> Brn3a markierte den einheitlich gestalteten Nucleus, jedoch nicht alle RGCs.<sup>50 60</sup> RBPMS färbte alle RGCs und davon das Zytoplasma. Dieses wies aber ungünstigerweise eine ungleichmäßige Form zwischen den Zellen auf.<sup>10 60</sup> Diese Schwierigkeiten beim Zählen bezüglich RBPMS betreffen somit nicht nur die manuelle Quantifizierung, sondern auch die Automatische.<sup>50</sup>

Da die GCL auch verdrängte amakrine Zellen besitzt und diese kleinen RGCs ähneln, kann dies zu ungenauen Ergebnissen führen. Deswegen zählten einige Arbeitsgruppen lieber Axone.<sup>117</sup>

Zur Darstellung und Untersuchung der Axone benutzten einige Studien bereits die Färbung mit Neurofilament-H.<sup>118 119 120</sup> Um Differenzen zwischen Test- und Kontrollgruppen herauszubekommen, stellte die Untersuchung der Fluoreszenzintensität eine sinnvolle Methode dar.<sup>90 88</sup> Die Berechnung der Fläche, der mit Neurofilament-H markierten Areale in Prozent im Vergleich zur Kontrolle konnte ebenso herangezogen werden.<sup>121</sup>

Nach Transektion wurde ein Verlust der Fluoreszenzintensität der Axone beobachtet.<sup>90</sup> Die Untersuchung von retinalen Neuropathien zeigte ebenfalls einen Rückgang der Axone gemessen anhand der Fluoreszenzintensität. Jedoch wurden hier Ratten für die Untersuchungszwecke benutzt.<sup>88</sup> Viele Studien untersuchten die Axonfunktion anhand des Markers, unter anderem auf genetischer Ebene.<sup>118 119</sup> Andere Studien zeigten einen Rückgang des Neurofilament-Markers in Modellen mit transgenetischen Mäusen, die für einen RGC- und Axonverlust prädisponiert sind.<sup>121</sup> Deren Ergebnisse sind somit nur eingeschränkt mit Unseren vergleichbar. Jedoch scheint die Nutzung des Markers eine gute Methode zu sein den Axonverlust darzustellen. Auch in unserer Gruppe wurde die Intensität der Färbung zur Beurteilung der Lebendigkeit der Zellen gemessen.<sup>122</sup>

Da in unseren Testgruppen nicht immer das Zytoplasma und der Nucleus einer RGC deckgleich zu sehen oder betroffen waren, deutet dies auf unterschiedliche Anfälligkeiten der Morphologie hin.<sup>72</sup> Jedoch markierten die Marker möglicherweise auch unterschiedliche Subpopulationen.<sup>63</sup> In unseren Kontrollbildern waren der Nucleus und das Zytoplasma einer RGC ebenfalls nicht immer deckgleich sichtbar.

Da Neurofilament-H neben Axonen auch alpha-RGCs markierte, lässt sich durch die Abnahme der Fluoreszenz neben dem Axonverlust ebenfalls auf einen Rückgang der alpha-RGCs schließen.<sup>72 88 90 121</sup> Anhand der bekannten topographischen Lage der alpha-RGCs und unserer Ergebnisse lässt sich folglich eine erhöhte Anfälligkeit der ON-/OFF-s RGCs gegenüber erhöhtem Druck, der ON-/OFF-t RGCs gegenüber oxidativem Stress schlussfolgern.<sup>52</sup>

SMI-32+RGCs waren in der Rattennetzhaut gleichmäßig verteilt.<sup>72</sup> Dies widerspricht unserer Vermutung, dass die Fluoreszenz der Axone mit den alpha-RGCs gleichgesetzt werden kann, da wir in der Kontrollgruppe unterschiedliche Verteilungen der Fluoreszenz hatten.

Eine andere Studie berichtete über unterschiedliche Verteilungen der SMI-32+RGCs beim Menschen. Die Morphologie, bezogen auf die mit SMI-32 markierten ON- und OFF-RGCs, zeigte je nach Lokalisation Differenzen. Unabhängig von der SMI-32+RGC Verteilung konnten wir nicht zwischen ON- und OFF-RGCs unterscheiden, da deren morphologische Merkmale voneinander abweichen. Sie kann auf diverse Funktionen und somit möglicherweise auf eine unterschiedliche Anfälligkeit gegenüber Schäden deuten.<sup>72</sup> Zur Beurteilung der OFF-RGCs hätte somit eine Doppelfärbung mit Brn3a durchgeführt werden müssen, wodurch jedoch auch keine Aussage über die ON-RGCs hätte getroffen werden können.<sup>63</sup>

Um die RGC-Degeneration zu beurteilen, können auch Querschnitte angewendet werden. Dies erlaubt die Beurteilung der einzelnen Retinaschichten und die Lage der RGCs nach Aussetzung der Testliquiden.

Der Vergleich von Querschnitten nach okulärer Hypertension mit Brn3a- sowie RBPMS-Färbung zeigte einen Rückgang der RGCs durch Hypertension. Die RGCs befanden sich in der Untersuchung jedoch immer noch in der GCL.<sup>123</sup> Genauso wurde über diese Erkenntnis nach ONC und Brn3a-Färbung berichtet.<sup>124</sup>

Wir entschieden uns für Flatmounts, da diese deutliche Vorteile für die Quantifizierung der RGCs bieten. Die gesamte RGC-Schicht kann auf einen Blick betrachtet werden. Zudem findet keine Gewebeerwerfung statt. Das Vorgehen der Beurteilung der RGCs anhand eines Flatmounts in Blütenblattform wurde schon von Mead et al., Salinas-Navarro et al. und Choe et al. präsentiert.<sup>61 67 125</sup>

Die sorgfältigste Methode der Quantifizierung ist das manuelle Zählen.<sup>57 126</sup> Sie ist jedoch sehr zeit- und arbeitsintensiv. Zudem sind Schwankungen zwischen den Untersuchern bekannt, welche unsere Abweichungen zu anderen Ergebnissen erklären.<sup>126</sup>

Meist wurde die Stichprobentechnik angewandt und dann für das vollständige Präparat als Prozentsatz im Vergleich zur Kontrolle hochgerechnet.<sup>57 58</sup> Diese Hochrechnung kann jedoch nur richtige Aussagen treffen, wenn die Stichproben in allen Entfernungen vom N. opticus gemacht wurden.<sup>57</sup> Wir erstellten die Bilder in drei unterschiedlichen Entfernungen zum N. opticus.

Unterschiede in der absoluten Anzahl der RGCs könnten sich dadurch ergeben, dass angeschnittene Zellen und nicht eindeutig identifizierbar gefärbte Zellen ausgeschlossen wurden. Daher war es bei den manuellen Zählungen wichtig, dass immer einheitlich gezählt wurde, zum Beispiel keine angeschnittenen Zellen.<sup>117</sup> Wurden dabei alle Präparate auf dieselbe Weise gezählt und verglichen, konnte dadurch eine Tendenz festgestellt werden.<sup>58</sup>

Es wurden in diversen Untersuchungen aber zum Teil auch spezielle Softwareprogramme zur Quantifizierung verwendet.<sup>126 67</sup> Die Softwareprogramme zeigen jedoch Limitationen und können nicht in jeder Studie einwandfrei benutzt werden: So eignet sich die Software RGCode nur für RBPMS-Zellen, wird jedoch für weitere Färbungen weiterentwickelt. Die Arbeitsgruppen von Masin und Claes beschäftigten sich ebenfalls mit RGCode. Es sei eine strengere wissenschaftliche Zählung, da sie im Vergleich zur manuellen Färbung neutral zählt. Zudem können die Software Ergebnisse verschiedener Studien verglichen werden.<sup>50 105</sup>

Das ImageJ-Skript zur halb-automatischen Quantifizierung eignete sich wiederum nur für Brn3a in Flatmount-Präparaten und nicht für unsere ebenfalls verwendete RBPMS-Färbung.<sup>58</sup>

Eine andere automatisierte frei verfügbare Software für RBPMS und Brn3a in Flatmounts hätte sich für unser Projekt angeboten.<sup>127</sup> Da wir in unserer AG bisher manuelle Zählungen durchführten, behielten wir dies auch in dieser Studie bei.<sup>104</sup> Obwohl die automatisierte Software wesentlich effizienter ist, stellt diese in vielen Fällen eine sehr kostenintensive Methode zur Zählung dar.<sup>58</sup>

In unbehandelten Retinae zeigte eine Untersuchung die meisten RGCs in der nasalen Hälfte, wie auch wir dies in unseren Ergebnissen zeigen konnten. Die Zählungen der anderen Studie wurden jedoch an Rattennetzhäuten durchgeführt.<sup>11</sup> Eine weitere Studie berichtete über eine hohe Dichte an RGCs im dorsalen Bereich der Kontrollgruppe.<sup>9</sup> Die Anzahl an RGCs pro mm<sup>2</sup> lag in vorangegangenen Studien bei ca. 3000, wobei die Zahlen zwischen 2755 und 3300 variieren.<sup>117 105 77</sup> Dies entspricht auch weitestgehend unseren Ergebnissen.

Zusammenfassend und im Vergleich mit den Ergebnissen anderer Studien scheint der oxidative Stress unabhängig von einem erhöhten Druck einen Einfluss auf den Untergang der Ganglienzellsomata und deren Axone beim Glaukom zu haben. Zudem scheinen unterschiedliche Anfälligkeiten zwischen Nucleus und Zytoplasma sowie zwischen den retinalen Quadranten und den RGC-Subpopulationen vorhanden zu sein.

Daraus ergibt sich ein komplexes Untergangsmuster der RGCs und der Axone beim Glaukom.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Schuster AK, Erb C, Hoffmann EM, Dietlein T, Pfeiffer N. The Diagnosis and Treatment of Glaucoma. *Dtsch Arztebl Int* 2020; **117**(13): 225-34.
2. Feng Y, Prokosch V, Liu H. Current Perspective of Hydrogen Sulfide as a Novel Gaseous Modulator of Oxidative Stress in Glaucoma. *Antioxidants (Basel)* 2021; **10**(5).
3. Gericke A, Mann C, Zadeh JK, et al. Elevated Intraocular Pressure Causes Abnormal Reactivity of Mouse Retinal Arterioles. *Oxid Med Cell Longev* 2019; **2019**: 9736047.
4. Mann C, Thanos S, Brockhaus K, Grus FH, Pfeiffer N, Prokosch V. [Endothelial Cell Reaction to Elevated Hydrostatic Pressure and Oxidative Stress in Vitro]. *Klin Monbl Augenheilkd* 2019; **236**(9): 1122-8.
5. Casson RJ, Chidlow G, Wood JP, Crowston JG, Goldberg I. Definition of glaucoma: clinical and experimental concepts. *Clin Exp Ophthalmol* 2012; **40**(4): 341-9.
6. Tham YC, Li X, Wong TY, Quigley HA, Aung T, Cheng CY. Global prevalence of glaucoma and projections of glaucoma burden through 2040: a systematic review and meta-analysis. *Ophthalmology* 2014; **121**(11): 2081-90.
7. Joshua D. Stein M, MS, and Pratap Challa, MD, Edited by Ingrid U. Scott M, MPH, and Sharon Fekrat, MD. Diagnosis and treatment of normal-tension glaucoma. 2007. <https://www.aao.org/eyenet/article/diagnosis-treatment-of-normal-tension-glaucoma>.
8. Völgyi B, Bloomfield SA. Axonal neurofilament-H immunolabeling in the rabbit retina. *J Comp Neurol* 2002; **453**(3): 269-79.
9. Nadal-Nicolás FM, Jiménez-López M, Sobrado-Calvo P, et al. Brn3a as a marker of retinal ganglion cells: qualitative and quantitative time course studies in naive and optic nerve-injured retinas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009; **50**(8): 3860-8.
10. Kwong JM, Caprioli J, Piri N. RNA binding protein with multiple splicing: a new marker for retinal ganglion cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010; **51**(2): 1052-8.
11. Danias J, Shen F, Goldblum D, et al. Cytoarchitecture of the retinal ganglion cells in the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; **43**(3): 587-94.
12. Laquis S, Chaudhary P, Sharma SC. The patterns of retinal ganglion cell death in hypertensive eyes. *Brain Res* 1998; **784**(1-2): 100-4.
13. Lee EJ, Yang HK, Kim TW, Hwang JM, Kim YH, Kim CY. Comparison of the Pattern of Retinal Ganglion Cell Damage Between Patients With Compressive and Glaucomatous Optic Neuropathies. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2015; **56**(12): 7012-20.
14. <Duale Reihe Anatomie (z-lib.org).pdf>.
15. <Augenheilkunde by Gerhard K. Lang (editor) (z-lib.org).pdf>.
16. <BASICS Augenheilkunde by Cordula Dahlmann (z-lib.org).pdf>.
17. Almasieh M, Wilson AM, Morquette B, Cueva Vargas JL, Di Polo A. The molecular basis of retinal ganglion cell death in glaucoma. *Prog Retin Eye Res* 2012; **31**(2): 152-81.
18. Weinreb RN, Aung T, Medeiros FA. The pathophysiology and treatment of glaucoma: a review. *Jama* 2014; **311**(18): 1901-11.
19. Höhn R, Nickels S, Schuster AK, et al. Prevalence of glaucoma in Germany: results from the Gutenberg Health Study. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2018; **256**(9): 1695-702.
20. Kapetanakis VV, Chan MP, Foster PJ, Cook DG, Owen CG, Rudnicka AR. Global variations and time trends in the prevalence of primary open angle glaucoma (POAG): a systematic review and meta-analysis. *Br J Ophthalmol* 2016; **100**(1): 86-93.
21. Rudnicka AR, Mt-Isa S, Owen CG, Cook DG, Ashby D. Variations in primary open-angle glaucoma prevalence by age, gender, and race: a Bayesian meta-analysis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; **47**(10): 4254-61.
22. Kingman S. Glaucoma is second leading cause of blindness globally. *Bull World Health Organ* 2004; **82**(11): 887-8.
23. Crabb DP, Smith ND, Glen FC, Burton R, Garway-Heath DF. How does glaucoma look?: patient perception of visual field loss. *Ophthalmology* 2013; **120**(6): 1120-6.

24. Kim KE, Kim MJ, Park KH, et al. Prevalence, Awareness, and Risk Factors of Primary Open-Angle Glaucoma: Korea National Health and Nutrition Examination Survey 2008-2011. *Ophthalmology* 2016; **123**(3): 532-41.
25. Quaranta L, Riva I, Gerardi C, Oddone F, Floriani I, Konstas AG. Quality of Life in Glaucoma: A Review of the Literature. *Adv Ther* 2016; **33**(6): 959-81.
26. Montana CL, Bhorade AM. Glaucoma and quality of life: fall and driving risk. *Curr Opin Ophthalmol* 2018; **29**(2): 135-40.
27. Jampel HD, Frick KD, Janz NK, et al. Depression and mood indicators in newly diagnosed glaucoma patients. *Am J Ophthalmol* 2007; **144**(2): 238-44.
28. Czudowska MA, Ramdas WD, Wolfs RC, et al. Incidence of glaucomatous visual field loss: a ten-year follow-up from the Rotterdam Study. *Ophthalmology* 2010; **117**(9): 1705-12.
29. Le A, Mukesh BN, McCarty CA, Taylor HR. Risk factors associated with the incidence of open-angle glaucoma: the visual impairment project. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; **44**(9): 3783-9.
30. Ramdas WD, Wolfs RC, Hofman A, de Jong PT, Vingerling JR, Jansonius NM. Ocular perfusion pressure and the incidence of glaucoma: real effect or artifact? The Rotterdam Study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011; **52**(9): 6875-81.
31. Stein JD, Khawaja AP, Weizer JS. Glaucoma in Adults-Screening, Diagnosis, and Management: A Review. *Jama* 2021; **325**(2): 164-74.
32. Zhao D, Cho J, Kim MH, Friedman DS, Guallar E. Diabetes, fasting glucose, and the risk of glaucoma: a meta-analysis. *Ophthalmology* 2015; **122**(1): 72-8.
33. Virtanen A, Haukka J, Loukovaara S, Harju M. Diabetes mellitus and risk of open-angle glaucoma-A population-based follow-up study. *Acta Ophthalmol* 2022.
34. Lin CC, Hu CC, Ho JD, Chiu HW, Lin HC. Obstructive sleep apnea and increased risk of glaucoma: a population-based matched-cohort study. *Ophthalmology* 2013; **120**(8): 1559-64.
35. Lin HZ, Hsieh TC, Wu JL, He MS, Lee YC. Systemic Alpha1-Adrenoceptor Antagonists and Increased Risk of Open-Angle Glaucoma: A Nationwide Population-Based Cohort Study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2020; **61**(10): 15.
36. Fan Gaskin JC, Shah MH, Chan EC. Oxidative Stress and the Role of NADPH Oxidase in Glaucoma. *Antioxidants (Basel)* 2021; **10**(2).
37. Tian H, Li L, Song F. Study on the deformations of the lamina cribrosa during glaucoma. *Acta Biomater* 2017; **55**: 340-8.
38. Burgoyne CF, Downs JC, Bellezza AJ, Suh JK, Hart RT. The optic nerve head as a biomechanical structure: a new paradigm for understanding the role of IOP-related stress and strain in the pathophysiology of glaucomatous optic nerve head damage. *Prog Retin Eye Res* 2005; **24**(1): 39-73.
39. Zhang J, Wu S, Wang N. Trans-lamina Cribrosa Pressure Difference Activates Mechanical Stress Signal Transduction to Induce Glaucomatous Optic Neuropathy: A Hypothesis. In: Wang N, ed. *Intraocular and Intracranial Pressure Gradient in Glaucoma*. Singapore: Springer Singapore; 2019: 179-83.
40. Barbosa-Breda J, Van Keer K, Abegão-Pinto L, et al. Improved discrimination between normal-tension and primary open-angle glaucoma with advanced vascular examinations - the Leuven Eye Study. *Acta Ophthalmol* 2019; **97**(1): e50-e6.
41. Heijl A, Leske MC, Bengtsson B, Hyman L, Bengtsson B, Hussein M. Reduction of intraocular pressure and glaucoma progression: results from the Early Manifest Glaucoma Trial. *Arch Ophthalmol* 2002; **120**(10): 1268-79.
42. Wang N, Xie X, Yang D, et al. Orbital cerebrospinal fluid space in glaucoma: the Beijing intracranial and intraocular pressure (iCOP) study. *Ophthalmology* 2012; **119**(10): 2065-73.e1.
43. Pillunat KR, Spoerl E, Jasper C, et al. Nocturnal blood pressure in primary open-angle glaucoma. *Acta Ophthalmol* 2015; **93**(8): e621-6.
44. Chrysostomou V, Rezanian F, Trounce IA, Crowston JG. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in glaucoma. *Curr Opin Pharmacol* 2013; **13**(1): 12-5.
45. Kelly DJ, Farrell SM. Physiology and Role of Intraocular Pressure in Contemporary Anesthesia. *Anesth Analg* 2018; **126**(5): 1551-62.

46. Nüssle S, Reinhard T, Lübke J. Acute Closed-Angle Glaucoma-an Ophthalmological Emergency. *Dtsch Arztebl Int* 2021; **118**(Forthcoming): 771-80.
47. Bonomi L, Marchini G, Marraffa M, et al. Prevalence of glaucoma and intraocular pressure distribution in a defined population. The Egna-Neumarkt Study. *Ophthalmology* 1998; **105**(2): 209-15.
48. Qureshi R, Azuara-Blanco A, Michelessi M, et al. What Do We Really Know about the Effectiveness of Glaucoma Interventions?: An Overview of Systematic Reviews. *Ophthalmol Glaucoma* 2021; **4**(5): 454-62.
49. Kolb H. Morphology and Circuitry of Ganglion Cells. In: Kolb H, Fernandez E, Nelson R, eds. *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System*. Salt Lake City (UT): University of Utah Health Sciences Center  
Copyright: © 2023 Webvision . 1995.
50. Masin L, Claes M, Bergmans S, et al. A novel retinal ganglion cell quantification tool based on deep learning. *Sci Rep* 2021; **11**(1): 702.
51. Escobar MJ, Reyes C, Herzog R, et al. Characterization of Retinal Functionality at Different Eccentricities in a Diurnal Rodent. *Front Cell Neurosci* 2018; **12**: 444.
52. Gallego-Ortega A, Norte-Muñoz M, Di Pierdomenico J, et al. Alpha retinal ganglion cells in pigmented mice retina: number and distribution. *Front Neuroanat* 2022; **16**: 1054849.
53. Kinder L, Palumaa T, Lindner M. Intrinsisch photosensitive retinale Ganglienzellen. *Der Ophthalmologe* 2022; **119**(4): 358-66.
54. Sanes JR, Masland RH. The types of retinal ganglion cells: current status and implications for neuronal classification. *Annu Rev Neurosci* 2015; **38**: 221-46.
55. Magaki S, Hojat SA, Wei B, So A, Yong WH. An Introduction to the Performance of Immunohistochemistry. *Methods Mol Biol* 2019; **1897**: 289-98.
56. Sharma RK, Netland PA. Early born lineage of retinal neurons express class III beta-tubulin isotype. *Brain Res* 2007; **1176**: 11-7.
57. Mead B, Tomarev S. Evaluating retinal ganglion cell loss and dysfunction. *Exp Eye Res* 2016; **151**: 96-106.
58. Geeraerts E, Dekeyser E, Gaublomme D, Salinas-Navarro M, De Groef L, Moons L. A freely available semi-automated method for quantifying retinal ganglion cells in entire retinal flatmounts. *Exp Eye Res* 2016; **147**: 105-13.
59. Nadal-Nicolás FM, Jiménez-López M, Salinas-Navarro M, et al. Whole number, distribution and co-expression of brn3 transcription factors in retinal ganglion cells of adult albino and pigmented rats. *PLoS One* 2012; **7**(11): e49830.
60. Rodriguez AR, de Sevilla Müller LP, Brecha NC. The RNA binding protein RBPMS is a selective marker of ganglion cells in the mammalian retina. *J Comp Neurol* 2014; **522**(6): 1411-43.
61. Mead B, Thompson A, Scheven BA, Logan A, Berry M, Leadbeater W. Comparative evaluation of methods for estimating retinal ganglion cell loss in retinal sections and wholemounts. *PLoS One* 2014; **9**(10): e110612.
62. Xiang M, Zhou L, Macke JP, et al. The Brn-3 family of POU-domain factors: primary structure, binding specificity, and expression in subsets of retinal ganglion cells and somatosensory neurons. *J Neurosci* 1995; **15**(7 Pt 1): 4762-85.
63. Krieger B, Qiao M, Rousso DL, Sanes JR, Meister M. Four alpha ganglion cell types in mouse retina: Function, structure, and molecular signatures. *PLoS One* 2017; **12**(7): e0180091.
64. Barabas P, Huang W, Chen H, et al. Missing optomotor head-turning reflex in the DBA/2J mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011; **52**(9): 6766-73.
65. Nuschke AC, Farrell SR, Levesque JM, Chauhan BC. Assessment of retinal ganglion cell damage in glaucomatous optic neuropathy: Axon transport, injury and soma loss. *Exp Eye Res* 2015; **141**: 111-24.
66. Taiyab A, Saraco A, Akula M, et al. Progressive Loss of Retinal Ganglion Cells in Activating Protein-2 $\beta$  Neural Crest Cell Knockout Mice. *Curr Eye Res* 2021; **46**(10): 1509-15.
67. Salinas-Navarro M, Jiménez-López M, Valiente-Soriano FJ, et al. Retinal ganglion cell population in adult albino and pigmented mice: a computerized analysis of the entire population and its spatial distribution. *Vision Res* 2009; **49**(6): 637-47.



68. Guo J, Qiang M, Ludueña RF. The distribution of  $\beta$ -tubulin isotypes in cultured neurons from embryonic, newborn, and adult mouse brains. *Brain Res* 2011; **1420**: 8-18.
69. Jiang SM, Zeng LP, Zeng JH, Tang L, Chen XM, Wei X.  $\beta$ -III-Tubulin: a reliable marker for retinal ganglion cell labeling in experimental models of glaucoma. *Int J Ophthalmol* 2015; **8**(4): 643-52.
70. van der Gucht E, Vandesande F, Arckens L. Neurofilament protein: a selective marker for the architectonic parcellation of the visual cortex in adult cat brain. *J Comp Neurol* 2001; **441**(4): 345-68.
71. Lim EJ, Kim IB, Oh SJ, Chun MH. Identification and characterization of SMI32-immunoreactive amacrine cells in the mouse retina. *Neurosci Lett* 2007; **424**(3): 199-202.
72. Tan H, Li X, Huang K, Luo M, Wang L. Morphological and distributional properties of SMI-32 immunoreactive ganglion cells in the rat retina. *J Comp Neurol* 2022; **530**(8): 1276-87.
73. Glovinsky Y, Quigley HA, Dunkelberger GR. Retinal ganglion cell loss is size dependent in experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991; **32**(3): 484-91.
74. Leung CK, Chan WM, Yung WH, et al. Comparison of macular and peripapillary measurements for the detection of glaucoma: an optical coherence tomography study. *Ophthalmology* 2005; **112**(3): 391-400.
75. La Morgia C, Di Vito L, Carelli V, Carbonelli M. Patterns of Retinal Ganglion Cell Damage in Neurodegenerative Disorders: Parvocellular vs Magnocellular Degeneration in Optical Coherence Tomography Studies. *Front Neurol* 2017; **8**: 710.
76. Bowd C, Weinreb RN, Williams JM, Zangwill LM. The retinal nerve fiber layer thickness in ocular hypertensive, normal, and glaucomatous eyes with optical coherence tomography. *Arch Ophthalmol* 2000; **118**(1): 22-6.
77. Edwards G, Lee Y, Kim M, Bhanvadia S, Kim KY, Ju WK. Effect of Ubiquinol on Glaucomatous Neurodegeneration and Oxidative Stress: Studies for Retinal Ganglion Cell Survival and/or Visual Function. *Antioxidants (Basel)* 2020; **9**(10).
78. Cui QN, Bargoud AR, Ross AG, Song Y, Dunaief JL. Oral administration of the iron chelator deferiprone protects against loss of retinal ganglion cells in a mouse model of glaucoma. *Exp Eye Res* 2020; **193**: 107961.
79. Zhang HK, Ye Y, Li KJ, Zhao ZN, He JF. Gypenosides Prevent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Induced Retinal Ganglion Cell Apoptosis by Concurrently Suppressing the Neuronal Oxidative Stress and Inflammatory Response. *J Mol Neurosci* 2020; **70**(4): 618-30.
80. Kimura A, Guo X, Noro T, et al. Valproic acid prevents retinal degeneration in a murine model of normal tension glaucoma. *Neurosci Lett* 2015; **588**: 108-13.
81. Akaiwa K, Namekata K, Azuchi Y, et al. Edaravone suppresses retinal ganglion cell death in a mouse model of normal tension glaucoma. *Cell Death Dis* 2017; **8**(7): e2934.
82. Harada C, Noro T, Kimura A, et al. Suppression of Oxidative Stress as Potential Therapeutic Approach for Normal Tension Glaucoma. *Antioxidants (Basel)* 2020; **9**(9).
83. Yum HR, Park HL, Park CK. Characteristics of Normal-tension Glaucoma Patients with Temporal Retinal Nerve Fibre Defects. *Sci Rep* 2020; **10**(1): 6362.
84. Schiefer U, Papageorgiou E, Sample PA, et al. Spatial pattern of glaucomatous visual field loss obtained with regionally condensed stimulus arrangements. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010; **51**(11): 5685-9.
85. Araie M, Yamagami J, Suzuki Y. Visual field defects in normal-tension and high-tension glaucoma. *Ophthalmology* 1993; **100**(12): 1808-14.
86. Boden C, Sample PA, Boehm AG, Vasile C, Akinopalli R, Weinreb RN. The structure-function relationship in eyes with glaucomatous visual field loss that crosses the horizontal meridian. *Arch Ophthalmol* 2002; **120**(7): 907-12.
87. Weber AJ, Kaufman PL, Hubbard WC. Morphology of single ganglion cells in the glaucomatous primate retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998; **39**(12): 2304-20.
88. Le Roux LG, Qiu X, Jacobsen MC, et al. Axonal Transport as an In Vivo Biomarker for Retinal Neuropathy. *Cells* 2020; **9**(5).
89. Soto I, Pease ME, Son JL, Shi X, Quigley HA, Marsh-Armstrong N. Retinal ganglion cell loss in a rat ocular hypertension model is sectorial and involves early optic nerve axon loss. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011; **52**(1): 434-41.

90. Kanamori A, Catrinescu MM, Traistaru M, Beaubien R, Levin LA. In vivo imaging of retinal ganglion cell axons within the nerve fiber layer. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010; **51**(4): 2011-8.
91. Harwerth RS, Wheat JL, Rangaswamy NV. Age-related losses of retinal ganglion cells and axons. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008; **49**(10): 4437-43.
92. Lee YH, Kim KN, Heo DW, Kang TS, Lee SB, Kim CS. Difference in patterns of retinal ganglion cell damage between primary open-angle glaucoma and non-arteritic anterior ischaemic optic neuropathy. *PLoS One* 2017; **12**(10): e0187093.
93. Hood DC, Raza AS, de Moraes CG, Liebmann JM, Ritch R. Glaucomatous damage of the macula. *Prog Retin Eye Res* 2013; **32**: 1-21.
94. Jo YH, Kwon J, Jeong D, Shon K, Kook MS. Rapid Central Visual Field Progression Rate in Eyes with Open-Angle Glaucoma and Choroidal Microvasculature Dropout. *Sci Rep* 2019; **9**(1): 8525.
95. Quigley HA, Green WR. The Histology of Human Glaucoma Cupping and Optic Nerve Damage: Clinicopathologic Correlation in 21 Eyes. *Ophthalmology* 2020; **127**(4s): S45-s69.
96. Plitz-Seymour JR. Visual fields in glaucoma. 2016. <https://entokey.com/visual-fields-in-glaucoma/>.
97. Jonas JB, Fernández MC, Stürmer J. Pattern of glaucomatous neuroretinal rim loss. *Ophthalmology* 1993; **100**(1): 63-8.
98. Quigley HA, Addicks EM. Regional differences in the structure of the lamina cribrosa and their relation to glaucomatous optic nerve damage. *Arch Ophthalmol* 1981; **99**(1): 137-43.
99. van der Merwe Y, Faust AE, Sakalli ET, et al. Matrix-bound nanovesicles prevent ischemia-induced retinal ganglion cell axon degeneration and death and preserve visual function. *Sci Rep* 2019; **9**(1): 3482.
100. Tong JB, Chen D, Zeng LP, et al. Differential changes of local blood supply in rat retinae are involved in the selective loss of retinal ganglion cells following the acute high intraocular pressure. *Curr Eye Res* 2010; **35**(5): 425-34.
101. Schaub JA, Kimball EC, Steinhart MR, et al. Regional Retinal Ganglion Cell Axon Loss in a Murine Glaucoma Model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2017; **58**(5): 2765-73.
102. Thonginnetra O, Greenstein VC, Chu D, Liebmann JM, Ritch R, Hood DC. Normal versus high tension glaucoma: a comparison of functional and structural defects. *J Glaucoma* 2010; **19**(3): 151-7.
103. Gu L, Kwong JM, Caprioli J, Piri N. DNA and RNA oxidative damage in the retina is associated with ganglion cell mitochondria. *Sci Rep* 2022; **12**(1): 8705.
104. Liu H, Anders F, Thanos S, et al. Hydrogen Sulfide Protects Retinal Ganglion Cells Against Glaucomatous Injury In Vitro and In Vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2017; **58**(12): 5129-41.
105. Claes M, Moons L. Retinal Ganglion Cells: Global Number, Density and Vulnerability to Glaucomatous Injury in Common Laboratory Mice. *Cells* 2022; **11**(17).
106. Danias J, Lee KC, Zamora MF, et al. Quantitative analysis of retinal ganglion cell (RGC) loss in aging DBA/2Nnia glaucomatous mice: comparison with RGC loss in aging C57/BL6 mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; **44**(12): 5151-62.
107. Lauzi J, Anders F, Liu H, et al. Neuroprotective and neuroregenerative effects of CRMP-5 on retinal ganglion cells in an experimental in vivo and in vitro model of glaucoma. *PLoS One* 2019; **14**(1): e0207190.
108. Liu H, Bell K, Herrmann A, et al. Crystallins Play a Crucial Role in Glaucoma and Promote Neuronal Cell Survival in an In Vitro Model Through Modulating Müller Cell Secretion. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2022; **63**(8): 3.
109. Bui BV, Edmunds B, Cioffi GA, Fortune B. The gradient of retinal functional changes during acute intraocular pressure elevation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; **46**(1): 202-13.
110. Quigley HA, Sanchez RM, Dunkelberger GR, L'Hernault NL, Baginski TA. Chronic glaucoma selectively damages large optic nerve fibers. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1987; **28**(6): 913-20.
111. Quigley HA, Dunkelberger GR, Green WR. Chronic human glaucoma causing selectively greater loss of large optic nerve fibers. *Ophthalmology* 1988; **95**(3): 357-63.

112. Stone J, Leventhal A, Watson CR, Keens J, Clarke R. Gradients between nasal and temporal areas of the cat retina in the properties of retinal ganglion cells. *J Comp Neurol* 1980; **192**(2): 219-33.
113. Guo Y, Johnson E, Cepurna W, Jia L, Dyck J, Morrison JC. Does elevated intraocular pressure reduce retinal TRKB-mediated survival signaling in experimental glaucoma? *Exp Eye Res* 2009; **89**(6): 921-33.
114. Nadal-Nicolás FM, Sobrado-Calvo P, Jiménez-López M, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M. Long-Term Effect of Optic Nerve Axotomy on the Retinal Ganglion Cell Layer. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2015; **56**(10): 6095-112.
115. Sánchez-Migallón MC, Nadal-Nicolás FM, Jiménez-López M, Sobrado-Calvo P, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M. Brain derived neurotrophic factor maintains Brn3a expression in axotomized rat retinal ganglion cells. *Exp Eye Res* 2011; **92**(4): 260-7.
116. Zhao D, Nguyen CT, Wong VH, et al. Characterization of the Circumlimbal Suture Model of Chronic IOP Elevation in Mice and Assessment of Changes in Gene Expression of Stretch Sensitive Channels. *Front Neurosci* 2017; **11**: 41.
117. Jeon CJ, Strettoi E, Masland RH. The major cell populations of the mouse retina. *J Neurosci* 1998; **18**(21): 8936-46.
118. Risner ML, Pasini S, McGrady NR, Calkins DJ. Bax Contributes to Retinal Ganglion Cell Dendritic Degeneration During Glaucoma. *Mol Neurobiol* 2022; **59**(3): 1366-80.
119. McGrady NR, Holden JM, Ribeiro M, Boal AM, Risner ML, Calkins DJ. Axon hyperexcitability in the contralateral projection following unilateral optic nerve crush in mice. *Brain Commun* 2022; **4**(5): fcac251.
120. Zhou L, Chen W, Lin D, Hu W, Tang Z. Neuronal apoptosis, axon damage and synapse loss occur synchronously in acute ocular hypertension. *Exp Eye Res* 2019; **180**: 77-85.
121. Weiss M, Reinehr S, Mueller-Buehl AM, et al. Activation of Apoptosis in a  $\beta$ B1-CTGF Transgenic Mouse Model. *Int J Mol Sci* 2021; **22**(4).
122. Wang M, Liu H, Xia N, et al. Intraocular Pressure-Induced Endothelial Dysfunction of Retinal Blood Vessels Is Persistent, but Does Not Trigger Retinal Ganglion Cell Loss. *Antioxidants (Basel)* 2022; **11**(10).
123. Boia R, Salinas-Navarro M, Gallego-Ortega A, et al. Activation of adenosine A(3) receptor protects retinal ganglion cells from degeneration induced by ocular hypertension. *Cell Death Dis* 2020; **11**(5): 401.
124. Bell K, Rosignol I, Sierra-Filardi E, et al. Age related retinal Ganglion cell susceptibility in context of autophagy deficiency. *Cell Death Discov* 2020; **6**: 21.
125. Choe TE, Abbott CJ, Piper C, Wang L, Fortune B. Comparison of longitudinal in vivo measurements of retinal nerve fiber layer thickness and retinal ganglion cell density after optic nerve transection in rat. *PLoS One* 2014; **9**(11): e113011.
126. Salinas-Navarro M, Mayor-Torroglosa S, Jiménez-López M, et al. A computerized analysis of the entire retinal ganglion cell population and its spatial distribution in adult rats. *Vision Res* 2009; **49**(1): 115-26.
127. Guymier C, Damp L, Chidlow G, Wood J, Tang YF, Casson R. Software for Quantifying and Batch Processing Images of Brn3a and RBPMS Immunolabelled Retinal Ganglion Cells in Retinal Wholemounts. *Transl Vis Sci Technol* 2020; **9**(6): 28.

## 7. Anhang

### 7.1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.....	30
Abbildung 2.....	34
Abbildung 3.....	39
Abbildung 4.....	42
Abbildung 5.....	43
Abbildung 6.....	43
Abbildung 7.....	43
Abbildung 8.....	44
Abbildung 9.....	45
Abbildung 10.....	45
Abbildung 11.....	46
Abbildung 12.....	47
Abbildung 13.....	47
Abbildung 14.....	48
Abbildung 15.....	48
Abbildung 16.....	51
Abbildung 17.....	52
Abbildung 18.....	52
Abbildung 19.....	52
Abbildung 20.....	53
Abbildung 21.....	54
Abbildung 22.....	54
Abbildung 23.....	54
Abbildung 24.....	55
Abbildung 25.....	56
Abbildung 26.....	56
Abbildung 27.....	56
Abbildung 28: RGC-Färbungen mit Brn3a und RBPMS im temporalen Quadranten.....	57
Abbildung 29: Axonfärbung mit Neurofilament-H im nasalen Quadranten.....	57
Abbildung 30: Querschnittsfärbungen mit Brn3a/RBPMS und DAPI.....	59
Abbildung 31.....	60
Abbildung 32.....	60
Abbildung 33.....	61
	83

Abbildung 34.....	61
Abbildung 35.....	62
Abbildung 36.....	63

## 7.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Die Tabelle beschreibt den Verlust (%), die Anzahl der RGCs/mm <sup>2</sup> sowie die Signifikanz in den Quadranten der mit Brn3a markierten Präparate. Dabei wird ersichtlich, dass durch die 60mmHg Behandlung alle Quadranten signifikant ( $p \leq 0,01$ ) betroffen waren und einen Verlust von $> 60\%$ aufwiesen. Bei den H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Präparaten war der nasale Quadrant am anfälligsten ( $p \leq 0,05$ ). Die Präparate waren anfälliger gegenüber 60mmHg als gegenüber H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . .....	42
Tabelle 2: Die Tabelle beschreibt den Verlust (%), die Anzahl der RGCs/mm <sup>2</sup> sowie die Signifikanz der mit RBPMS markierten Präparate. Hierbei wird ersichtlich, dass temporal in den 60mmHg-Präparaten den höchsten Verlust aufwies, während nasal in den H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Präparaten einen signifikanten ( $p \leq 0,05$ ) Verlust zeigte.....	44
Tabelle 3: Die Tabelle beschreibt den Verlust (%), die Stärke der Fluoreszenz/mm <sup>2</sup> (IntDen) sowie die Signifikanz der mit Neurofilament-H markierten Präparate. Hierbei wird ersichtlich, dass temporal und inferior am anfälligsten gegenüber 60mmHg waren. Ebenfalls waren sie anfälliger gegenüber 60mmHg als gegenüber H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . .....	46
Tabelle 4: Die Tabelle beschreibt den Verlust (%), die Anzahl der RGCs/mm <sup>2</sup> sowie die Signifikanz der mit Brn3a markierten Präparate. Hierbei wird ersichtlich, dass die 60mmHg-Präparate signifikant stärker von einem Verlust betroffen waren als die H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Präparate. ....	51
Tabelle 5: Die Tabelle beschreibt den Verlust (%), die Anzahl der RGCs/mm <sup>2</sup> sowie die Signifikanz der mit RBPMS markierten Präparate. Die H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Präparate wiesen zentral und mittig einen höheren Verlust auf als die 60mmHg-Präparate. ....	53
Tabelle 6: Die Tabelle beschreibt den Verlust (%), die Stärke der Fluoreszenz/mm <sup>2</sup> (IntDen) sowie die Signifikanz der mit Neurofilament-H markierten Präparate. Dabei wird ersichtlich, dass Zentral einen deutlichen Verlust unter H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Bedingungen aufwies, während Peripher einen signifikanten Verlust unter 60mmHg aufwies. ....	55
Tabelle 7: Die Tabelle beschreibt den Verlust, die Anzahl der RGCs/mm <sup>2</sup> und die Fluoreszenzstärke (IntDen) der Querschnitte.....	58

